



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 35/00, 35/12, 35/70, 35/72, 35/74, 35/78, 7/16, 31/70, C07H 7/033, A23L 3/3562		A1	(11) 国際公開番号 WO97/33593
			(43) 国際公開日 1997年9月18日(18.09.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00527		(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)	
(22) 国際出願日 1997年2月25日(25.02.97)		(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 小山信人(KOYAMA, Nobuto)(JP/JP) 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)(JP/JP) 小林英二(KOBAYASHI, Eiji)(JP/JP) 榎 竜嗣(ENOKI, Tatsuji)(JP/JP) 務 華康(WU, Hua-Kang)(CN/JP) 西山英治(NISHIYAMA, Eiji)(JP/JP) 出口寿々(DEGUCHI, Suzu)(JP/JP) 猪飼勝重(IKAI, Katsushige)(JP/JP) 大野本宏(OHNOGI, Hiromu)(JP/JP) 上田元子(UEDA, Motoko)(JP/JP)	
(30) 優先権データ 特願平8/85972 1996年3月15日(15.03.96) JP 特願平8/174411 1996年6月14日(14.06.96) JP 特願平8/233719 1996年8月16日(16.08.96) JP 特願平8/275231 1996年9月27日(27.09.96) JP 特願平8/325900 1996年11月22日(22.11.96) JP		(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)	
		(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US, VN, ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)	
		添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: A PRODUCT OF HEAT TREATMENT OF URONIC ACID, FOOD, DRINK OR DRUG INCLUDING THE PRODUCT			
(54)発明の名称 ウロン酸類の加熱処理物、それを含有する食品、飲料又は医薬			
(57) Abstract A product of heat treatment of at least one member selected from among (a) uronic acid or uronic acid derivatives, (b) a saccharide containing uronic acid or uronic acid derivatives, and (c) a substance comprising a saccharide containing uronic acid or uronic acid derivatives; and food, drink or drug characterized by containing this product.			

(57) 要約

- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、及び
- (c) ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物
- より選択される少なくとも1種の物の加熱処理物、及び該加熱処理物を含有することを特徴とする食品、飲料又は医薬。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SK	スロバキア
BB	バハマ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	ジョージア	MC	モナコ	SS	スーダン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SD	スーダン
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CC	ココス（キリング）	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IT	イタリア	MW	モザンビーク	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	JP	日本	MX	メキシコ	US	アメリカ合衆国
CN	中国	KE	ケニア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CO	コロンビア	KR	韓国	NL	オランダ	VN	ベトナム
CZ	チェコ	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LL	リトアニア	RO	ルーマニア		

ウロン酸類の加熱処理物、それを含有する食品、飲料又は医薬

### 発明の属する技術分野

本発明の目的は、制がん作用、アポトーシス誘発作用等を有する安全性の高い生理活性物質含有物を開発し、該含有物を含有する、生理的效果に優れた機能性食品又は飲料を提供することにある。また本発明は該含有物を有効成分とする抗菌剤、歯磨剤、防腐剤、アポトーシス誘発剤、制がん剤、抗潰瘍剤を提供する。また本発明はアポトーシス機構解明、アポトーシス誘発阻害剤スクリーニング等に有用なアポトーシス誘発方法も提供し、本発明の生理活性物質含有物質の製造方法も提供する。

### 従来の技術

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポブトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現させることができれば、不要若しくは病原細胞、例えばがん細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、制がん作用、アポトーシス誘発作用等を有する安全性の高い生理活性物質含有物を開発し、該含有物の製造方法及び該含有物を含有する食品又は飲料を提供することにある。また本発明の目的は該化合物を含有する抗菌剤、アポトーシス誘発剤等の医薬品、及び該含有物を有効成分として使用するアポト

### 課題を解決するための手段

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は下記 (a)、(b)、(c) より

選択される少なくとも1種の物の加熱処理物である。

- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、
- (c) ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物。

本発明の第2の発明は下記(a)、(b)、(c)より選択される少なくとも1種の物を加熱処理する工程を包含することを特徴とする加熱処理物の製造方法である。

- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
- (b) ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、
- (c) ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物。

本発明者らはウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸含有糖化合物、ウロン酸誘導体含有糖化合物、ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物から選択される少なくとも1種の物の加熱処理物（以下、本発明の加熱処理物と称す）が強い制がん作用、アポトーシス誘発作用、抗菌作用、抗潰瘍作用を有することを見出し、本発明を完成した。

#### 図面の簡単な説明

図1はペクチン加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図2は透析処理前後の試料のがん細胞に対する作用を示すものである。

図3は限外ろ過液のがん細胞に対する作用を示すものである。

図4はゲルろ過画分のがん細胞に対する作用を示すものである。

図5はウロン酸加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図6はウロン酸加熱処理時のpHと加熱物のがん細胞に対する作用の関係を示すものである。

図7はペクチンの酸性下加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図8はペクチンの酸性下加熱処理物の溶媒抽出画分のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 9 はペクチンのアルカリ性下に次いで酸性下での加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 10 はガラクトツロン酸の酸性下加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 11 はグルクロン酸の酸性下加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 12 はペクチン加熱処理液 I のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 13 はグルクロン酸加熱処理物の希釈倍数と細胞生存率の関係を示すものである。

図 14 はアルギン酸加熱処理物のがん細胞に対する作用を示すものである。

図 15 はペクチン加熱処理物の白血病細胞株に対する制がん作用を示すものである。

図 16 はウロン酸加熱処理物の白血病細胞株に対する制がん作用を示すものである。

図 17 はウロン酸加熱処理物の分化誘導作用を示すものである。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において、ウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸含有糖化合物、ウロン酸誘導体含有糖化合物、ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物とは、その加熱処理物が制がん作用、アポトーシス誘発性等を有し、その加熱処理物中に制がん活性物質及び／又はアポトーシス誘発性物質が生成されれば特に限定はない。

ウロン酸はグリクロン酸ともいい、アルドースのアルデヒド基はそのままにして他端の第 1 アルコール基だけをカルボキシル基に酸化したヒドロキシアルデヒド

酸を含有する多糖としては、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、ペクチン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸等があり、

種々の生理機能が知られている。

本発明で使用することができるウロン酸は特に限定されるものでなく、例えばガラクトツロン酸、グルクロン酸、グルロン酸、マンヌロン酸、イズロン酸等があり、ウロン酸の誘導体としては、それらのラクトン、それらのエステル、それらのアミド、それらの塩等があり、加熱処理により制がん活性物質及び／又はアポトーシス誘発活性物質を生成する物は全て本発明の誘導体に包含される。ウロン酸のラクトンとしてはグルクロノー6, 3-ラクトン（以下グルクロノラクトンと略記する）、マンヌロノー6, 3-ラクトン、イズロノー6, 3-ラクトン等が例示される。ウロン酸エステルとしては、例えばメチルエステル、エチルエステル、プロピレングリコールエステル、カルボキシメチルエステル等がありウロン酸より製造することができる。又ウロン酸のアミド化によりウロン酸アミドも製造することができる。更にこれらの塩は常法により製造することができる。

次に本明細書において、ウロン酸、ウロン酸誘導体を含有する糖化合物とは、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物を意味し、それらは特に限定されるものでなく、例えばペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、それらの化学的、酵素的、物理的処理物である、その分解物、分解物の誘導体、分解物の塩を使用することができる。

前記の化学的な処理方法としては、原料糖化合物を例えば室温～200℃で数秒～数時間、好ましくは50～130℃で数秒～60分処理すれば良く、ペクチンの場合、例えばpH6.8、95℃で数分～数十分処理することにより $\beta$ -脱離反応が生じ、235nm付近の吸光度が増大した不飽和ウロン酸及び／又は不飽和ウロン酸エステルを有する糖化合物が得られる。本発明の糖化合物にはウロン酸及び／又はウロン酸エステルを含有する多糖類の $\beta$ -脱離反応により生成する非還元末端に不飽和ウロン酸及び／又は不飽和ウロン酸エステルを含有する糖化合物が含まれる。

また前記の酵素的な処理方法としては、原料糖化合物のウロン酸及び／又は

ウロン酸エステル含有多糖加水分解酵素によるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。また、ウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖リアーゼによるウロン酸及び／又はウロン酸エステル含有多糖の公知の分解が挙げられる。例えばペクチン、ペクチン酸の場合、各々公知のペクチンリアーゼ（EC 4. 2. 2. 10）、ペクチン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 2）、エキソポリガラクトuron酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 9）で分解することによって、非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート（4-deoxy-L-threo-hex-4-enopyranosyl uronate）又はそのメチルエステルを有する糖化合物が得られる。また、ヒアルロン酸の場合はヒアルロン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 1）、アルギン酸の場合はアルギン酸リアーゼ（EC 4. 2. 2. 3）が使用される。この非還元末端に4-デオキシ-L-トレオ-ヘキス-4-エノピラノシル ウロネート又はそのメチルエステルを有する酵素分解物も本発明の糖化合物に包含される。

更に前記の物理的な処理方法としては、原料糖化合物の近赤外線、赤外線、マイクロ波、超音波処理等が挙げられ、例えばペクチン及び／又はペクチン酸をpH中性又はアルカリ性の溶液中に入れ、温度は適宜、室温以上で、適宜還元下、例えばアスコルビン酸存在下で、時間は1秒以上、好ましくは5秒～1時間の超音波処理をし、振動エネルギーを与えることが挙げられる。なお超音波以外にもマイクロ波、近赤外線、赤外線等の照射も有効で、これらを組合せ照射しても良い。照射は連続的に行っても良く、断続的に行っても良い。

また本発明においてはこれらのウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の含有物、例えば果物、果物果皮、果物搾汁かす、野菜、野菜搾汁かす、海藻等をそのまま、あるいは乾燥、粉碎して用いても良く、またこれらのウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の含有物よりのウロン酸及び／

また本発明においては、ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の抽出液の調製方法、抽出液からの精製方法は公知の方法で行えば良く、特に限定

はない。

ウロン酸又はウロン酸エステルを含有する糖化合物含有物としてはリンゴ、例えばミカン、レモン等の柑橘類、バナナ、白菜、キャベツ、レタス、シソ、カボチャ、セロリ、ゴボウ、エシャロット、ブロッコリー、ピーマン、ほうれん草、人参、人参の葉、大根の葉、茶、ゴマ、マメ、イモ等の双子葉類植物の果実、野菜、葉、種実等、麦、米等の单子葉植物の穀物、褐藻類、例えば昆布、ワカメ等、紅藻類、緑藻類、単細胞緑藻類等の藻類、微生物としてはリオフィラム ウルマリウム、ハタケシメジ、ナメコ、シイタケ、エノキタケ、ヒラタケ、マッシュルーム等の担子菌類、サナギタケ、ノムシタケ等の子のう菌類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌等、動物としては脊椎動物又は無脊椎動物が例示され、本発明においては、これらの植物、微生物又は動物由来のウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の含有物を使用することができる。

ウロン酸、ウロン酸誘導体を含有する糖化合物である多糖類は公知の化学的、酵素学的、物理的な処理方法により製造することができる。例えばペクチンとしては、例えば柑橘類の果皮及びリンゴの果実より抽出される高分子の多糖類を使用することができる。工業的なペクチン製造の原料はフルーツで、レモン、ライム等の柑橘類のジュースのしぼりかす（主として内果皮）が用いられるほか、リンゴのジュースのしぼりかすも用いられている。ジュースのしぼりかすには主として不溶性のプロトペクチンが含まれており、製造の段階でこれを可溶化（抽出）し、ペクチンを調製する。可溶化は酸性の温水～熱水で抽出することによって行うことができ、抽出時の温度、pH、時間条件を原料に合わせてコントロールすることにより、分子量やエステル化度の一定なペクチンを高収量で製造することができる。抽出液は遠心分離やろ過によって精製し、濃縮後アルコールを添加してペクチンを沈殿させ回収することができる。回収された沈殿を乾燥、粉碎し、所定の乾燥ペクチンを調製することができる。

ペクチンの主構造は、部分的にメチル化されたガラクトツロン酸のポリマーであ



る。カルボキシル基はメチルエステル化されたり、フリーの酸のままか、あるいはアンモニウム塩、カリウム塩、又はナトリウム塩化されている。ペクチンはメチルエステル化度（DM度：全カルボキシル基に対するメトキシル基の割合）によって、DM度の高いHMペクチン及びDM度の低いLMペクチンに分類され（吉積智司ほか編、（株）光琳発行、新食品開発用素材便覧、第114～119頁（1991））、本発明においては市販の食品添加物ペクチン（外山章夫編、食品と科学社発行、天然物便覧、第12版、第138頁（1993））、市販のHMペクチン、LMペクチン等（前出の新食品開発用素材便覧）を使用することができる。

ウロン酸及び／又はウロン酸誘導体を含有する糖化合物の分解物は、公知の化学的、酵素学的、物理的な処理方法により製造することができる。また合成法により合成されるウロン酸、ウロン酸誘導体、オリゴ糖等も本発明に包含されるものである。

本発明に使用する加熱処理物は、（a）ウロン酸又はウロン酸誘導体、（b）ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、（c）ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物から選択される物を原料として製造することができる。

本発明の加熱処理物の製造における加熱処理方法としては、ウロン酸、ウロン酸誘導体、ウロン酸含有糖化合物、ウロン酸誘導体含有糖化合物、ウロン酸含有糖化合物含有物及び／又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物を例えば60～350℃で数秒～数日、好ましくは80～150℃で数分～数日加熱処理すれば良く、ペクチンの場合、例えば80～150℃で数分～数日の加熱処理を行うことにより、制がん作用アポトーシス誘発性等の生理活性を有する加熱処理物を得る

ことができ、数分～数日加熱処理することにより、目的の加熱処理物を得ることができる。

加熱処理時のpHは特に限定はないが、中性から酸性下で行うのが好ましく、その原料に応じ加熱処理時のpHを調整すればよいが、通常は酸性下の加熱処理により、制がん活性物質、アポトーシス誘発活性物質等の生理活性物質の生成が加速される。

加熱処理時の原料の濃度はその加熱処理により制がん活性物質、アポトーシス誘発活性物質等の生理活性物質を生成しうる範囲内であれば特に限定は無く、操作性、収率等の点を考慮し設定すれば良い。

本発明における加熱処理は湿式加熱でも、乾燥加熱でも良い。湿式加熱としては、水蒸気加熱、水蒸気加圧加熱、加圧式加熱等任意の湿式加熱方法を用いることができる。乾燥加熱としては、乾燥熱風による直接加熱法、熱源から隔壁を通して加熱する間接加熱法等が使用できる。直接加熱方法としては、気流乾熱法、噴霧乾熱法等があり、間接加熱法としてはドラム乾熱法等が使用できる。また本発明の加熱処理物の原料は通常の、煮る、焼く、炒る、煎じる、蒸す、炒める、揚げる等の任意の加熱方法で処理することができる。

本発明の加熱処理物とは上記加熱方法で得られる加熱処理物、及び該加熱処理物中の生理活性物質を含有する画分である。

本発明の加熱処理物中には複数のアポトーシス誘発作用、制がん作用、抗菌作用、抗ウイルス作用等を示す物質が生成されており、また抗酸化作用を有するレダクトン類も、本発明の加熱処理物中に生成される。従って目的に応じて、加熱処理条件を変えることにより、希望する物質を有する本発明の加熱処理物を調製することができる。本発明の加熱処理物はその生理活性を指標に分画でき、例えば加熱処理物の分子量分画を公知の方法、例えばゲルろ過法、分子量分画膜による分画法等により行い、各分子量分画を調製することにより、高活性の本発明の加熱処理物を調製することができる。又、溶媒抽出法、分留法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等により目的の画分を調製することができ

る。

ゲルろ過法の例としては、セルロフィンGCL-300を使用し、例えば分子量25000超、分子量25000～10000超、分子量10000～5000超、分子量5000以下等の任意の分子量画分を調製でき、セルロフィンGCL-25を用い、例えば分子量5000以下の画分を分子量5000～3000超、分子量3000～2000超、分子量2000～1000超、分子量1000～500超、分子量500以下等の任意の分子量画分に調製することができる。

また限外ろ過膜を用いて工業的に分子量分画を行うことができ、例えばダイセル社製FE10-FUS0382を用いることにより分子量3000以下の画分を、同FE-FUS-T653を使用することによって分子量6000以下の画分を調製することができる。更にナノフィルター膜を用いることにより分子量500以下の画分を得ることもでき、これらのゲルろ過法、分子量分画法を組み合わせることにより、任意の分子量画分を調製することができる。

本発明の加熱処理物は分子量分画3000以下の画分に強い制がん活性、アポトーシス誘発活性を有し、特に分子量分画1000以下の画分、好適には分子量500以下の画分に強い制がん活性、アポトーシス誘発活性、抗菌活性等が認められ、目的に応じ、本発明の加熱処理物の分子量分画物を本発明の加熱処理物の有効成分として用いることができる。

本発明の加熱処理物はがん細胞増殖抑制活性を有する。本発明の加熱処理物のがん細胞増殖抑制の作用機作は、本発明を何ら限定するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用も本発明に包含される。

本発明の加熱処理物は、例えばヒト前骨性白血病細胞HL-60、ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞MOLT-3、肺がん細胞A-549、SV40形質転換

肺細胞WI-38VA13、肝がん細胞Hep G2、結腸がん細胞HCT 116、ヒト結腸がん細胞SW480、ヒト結腸がん細胞WiDr、胃がん細胞AGS、ミエローマ細胞等のがん細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘発活性を有し、本発明の加熱処理物中の制がん活性物質量は制がん活性単位で表示することができる。

本明細書において制がん活性単位とは、本発明の加熱処理液を試料とし、その希釈液0.5mlを用い、 $2.5 \times 10^5$ 個のヒト前骨性白血病細胞HL-60細胞(ATCC CCL-240)を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地4.5mlに添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で24時間培養した後、生細胞数を測定し、細胞生存率が対照の50%になる培地1ml当たりの制がん活性を1単位と定義し、培地1ml当たりの制がん活性が1単位と算出される場合、試料1mlは10単位の制がん活性を有する。

なお、細胞生存率R(%)は下記式で計算する。

$$R = V_s / (V_s + D_s) \times 100 + D_c / (V_c + D_c) \times 100$$

なお、式中で $V_s$ 、 $D_s$ はそれぞれ試料添加時の生細胞数と死細胞数、 $V_c$ 、 $D_c$ はそれぞれ水添加時の生細胞数と死細胞数を示す。

本発明の加熱処理物は天然食物由来物質であり、マウスに経口投与、非経口投与を行っても毒性は認められない。

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば原料として穀類、いも及びデンプン類、甘味料類、油脂類、種実類、豆類、魚介類、獣鳥鯨肉類、卵類、乳類、野菜類、果実類、きのこ類、藻類等を使用して製造される菓子類、パン類、麺類、嗜好飲料類(非アルコール飲料、アルコール飲料)、調味料、醸造物(味噌、醤油、食酢)、酒類及び香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に本発明の加熱処理物が含有されていれば良い。

調理及び加工においては、調理、加工後に制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する本発明の加熱処理物が含有されていれば良い。

すなわち調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後に制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する本発明の加熱処理物を添加してもよいし、調理及び加工品やその材料を、制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する本発明の加熱処理物へ添加し、該加熱処理物を希釈してもよい。

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程で、加熱処理を行い、制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する、本発明の加熱処理物を含有させれば良く、また制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する、本発明の加熱処理物を添加してもよいし、食品又は飲料やその原料を、制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する、本発明の加熱処理物へ添加し、該加熱処理物を希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、簡便に新規な制がん作用、アポトーシス誘発作用等を有する食品又は飲料を製造することができる。また製造時においてウロン酸、ウロン酸のラクトン、ウロン酸エステル、ウロン酸及び／又はウロン酸エステルを含有する糖化合物又は糖化合物含有物を含有せしめ、製造時において生成した制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する、その加熱処理物を構成成分とする食品又は飲料も本発明に包含される。いずれの工程を経た場合も、制がん作用、アポトーシス誘発性等を有する、本発明の加熱処理物を含有する食品又は飲料、本発明の加熱処理物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

加熱処理物の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば加熱処理物の含有量は食品100部当り加熱処理物固

形物換算で0.001部以上、食品としての官能、制がん作用、アポトーシス誘発作用、抗菌力等の生理活性の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1部である。

本発明において、制がん作用、アポトーシス誘発性、抗菌力等を有する本発明の加熱処理物の飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば加熱処理物の含有量は飲料100部当り加熱処理物固形物で0.001部以上、飲料としての食味、制がん作用、アポトーシス誘発作用、抗菌力等の生理活性の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

本発明の制がん作用を有する食品中の加熱処理物含有量は、制がん活性の点より適宜選択できるが、食品100g当り制がん活性単位として0.1単位以上、好ましくは10単位以上、更に好適には100単位以上である。

又本発明の制がん作用を有する飲料中の加熱処理物の含有量は特に制限されず、制がん活性の点より適宜選択できるが、飲料100g当り制がん活性単位として0.1単位以上、好ましくは10単位以上、更に好適には100単位以上である。

本発明の食品又は飲料としては、本発明の制がん作用、アポトーシス誘発性、抗菌力等を有する、本発明の加熱処理物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明の加熱処理物を多量に含有し、該加熱処理物の有する種々の生理活性、抗菌力、アポトーシス誘発作用、制がん作用、抗ウイルス作用、抗潰瘍作用、血管新生抑制作用、肝機能改善作用、食物繊維作用、鉄・重金属等の不要金属除去作用等によって、これらを摂取すること

により発がん予防、がん抑制効果、抗潰瘍効果、肝機能改善効果、便秘予防効果、インフルエンザウイルスによるかぜの予防効果、アルツハイマー病予防効果を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。またその抗菌力により、極めて保存性の良い、食品又は飲料である。

本発明の加熱処理物は食品又は飲料の保存性を向上させる防腐剤として使用することができる。また、本発明の加熱処理物を食品又は飲料に添加し、食品又は飲料を防腐する方法に使用することができる。

抗菌性を有する本発明の加熱処理物はウロン酸、ウロン酸のラクトン、ウロン酸エステル、ウロン酸を含有する糖化合物及び／又はウロン酸エステルを含有する糖化合物等の加熱処理により、容易に調製でき、天然食品由来の本発明の加熱処理物を含有する抗菌剤の食品又は飲料への使用は極めて安全性に優れたものである。

食品又は飲料に添加する場合の本発明の加熱処理物含有抗菌剤の形状は、液状、ペースト状、粉末状、フレーク状、顆粒状等いずれの形状でも良い。取り扱いやすさや、他の添加物と混合して使用することも考えれば、乾燥して粉末状、フレーク状、顆粒状にすることが好ましい。乾燥方法としては、通常の乾燥方法、例えばスプレー乾燥、ドラム乾燥、棚式乾燥、真空乾燥、凍結乾燥などで行うことができる。

本発明の抗菌剤及び防腐剤は当業者に公知のいかなる方法によっても製造することができ、その製造に際しては、製剤上許容される公知の添加物、例えば賦形剤、安定剤、崩壊剤、結合剤、溶解補助剤等を適宜添加しても良い。またエタノール、グリシン、酢酸ナトリウム、アスコルビン酸、グリセリン脂肪酸エステル、

本発明の加熱処理物の食品又は飲料への添加量は食品又は飲料の種類により異なり、その目的に応じた量を添加すれば良い。

本発明の抗菌剤の使用方法として、食品又は飲料に適当な方法で添加する方法が行われる。添加する方法は特に制限はなく、要するに何らかの方法で本発明の加熱処理物が食品又は飲料に含有されれば良い。したがって、本発明の抗菌剤の使用において、添加とは本発明の加熱処理物を食品又は飲料中に含有させるいかなる方法も含む。通常の方法は食品又は飲料の製造工程中に添加するが、本発明の加熱処理物を含有する溶液に食品を一定時間浸漬する方法も用いることができる。更にまた、食品中に添加する方法と浸漬方法を併用することもできる。浸漬方法に適する食品としては、水中でも形くずれしない食品、例えば、蒲鉾、ウィンナソーセージ等の魚畜肉練り製品、ゆで麺等の麺類、冷凍前の海老、貝、魚類等の冷凍食品などを挙げることができる。

本発明の抗菌剤を防腐剤として用いることにより、食品又は飲料の保存性を一段と向上させることができる。また冷凍食品や冷菓等においては、冷凍前の加工工程において、汚染した微生物の増殖を抑制することができ、衛生上極めて好ましい結果を得ることができる。本発明の抗菌剤はグラム陽性細菌、グラム陰性細菌の両方に効果を有し、例えばメチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の薬剤耐性菌、サルモネラ菌、エンテロトキシン生産性黄色ブドウ球菌、嘔吐型のバチルス セレウス、下痢型のバチルス セレウス、腸出血性大腸菌O-157等の食中毒菌に極めて有効である。また、酵母、カビ等の微生物にも有効である。特に本発明の加熱処理物を含有する防腐剤は天然の食中毒予防剤、除菌剤として有用性が高い。なお、本発明の抗菌剤を用い、衣服、敷布等の殺菌を行うことができ、本発明の抗菌剤を散布すること、本発明の抗菌剤での拭取り等により目的物の除菌、殺菌を行うことができる。

本発明の抗菌剤は虫歯菌や歯周病菌にも抗菌活性を示し、本発明の抗菌剤を含有する口内用剤を提供することができる。口内用剤の形状は液状、ペースト状等の公知の形状とすることができる。口内用剤としては歯磨剤が例示される。歯磨剤としては液状でもよく、またペースト状、粉末状でもよく、公知の歯磨剤の形



状とすることができる。歯磨剤中の本発明加熱処理物の含有量は特に制限されず、虫歯菌や歯周病菌に対する有効濃度が含有されていればよい。歯磨剤中には公知の添加剤、例えば湿潤剤、界面活性剤、結合剤、香料、甘味料等を添加すればよい。本発明の歯磨剤の有効成分としては前述の様に、ウロン酸、ウロン酸エステルを含有する糖化合物の含有物、例えばペクチン含有物、例えば野菜、果物等の加熱処理物も使用でき、ペクチン含有野菜の加熱処理物を含有する口内用剤、例えば歯磨剤も本発明に包含される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、アポトーシス誘発性を有する、本発明の加熱処理物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればよい。一般的には、本発明の加熱処理物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明のアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるアポトーシス誘発活性を有する加熱処理物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、

— 図 1 —

に、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与され

る。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明のアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当たり20～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

制がん作用を有する本発明の加熱処理物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。一般的には、本発明の加熱処理物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適

用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り20～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物は制がん作用を有するが、低濃度ではがん細胞の分化誘導能を有し、本発明の加熱処理物はがん細胞の分化誘導剤（脱がん剤）としても有用である。本発明の加熱処理物を有効成分とするがん細胞分化誘導剤は、上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

がん細胞分化誘導剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り0.2～500mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の加熱処理物は抗ウイルス作用や肝機能改善作用を有し、本発明の加熱処理物を有効成分とする抗ウイルス剤や肝機能改善剤を、上記制がん剤に準じ、製剤化することができ、制がん剤に準じた方法で投与することができる。

抗ウイルス剤や肝機能改善剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り0.2～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって

変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもでき、本発明の加熱処理物含有物を摂取することにより、インフルエンザウイルスによる風邪等のウイルス性疾患が予防、治療でき、肝機能障害も改善され、GOT、GPT値が正常化する。

本発明の加熱処理物は70-kダルトン等の熱ショックタンパク (heat shock protein) 誘導活性を有し、肝炎ウイルス、エイズウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のRNAウイルス、DNAウイルスに対する抗ウイルス作用を有する。又抗炎症等の生体防御作用をも有する。

抗潰瘍作用を有する本発明の加熱処理物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば抗潰瘍剤を製造することができる。抗潰瘍剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。一般的には、本発明の加熱処理物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

抗潰瘍剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

抗潰瘍剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

抗潰瘍剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般に

は製剤中に含有される本発明の加熱処理物の量が成人1日当り20～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明によれば制がん作用、アポトーシス誘発作用等の生理活性を有し、がん患者や、ウイルス性疾患において、病変細胞に制がん作用やアポトーシスを誘発させ、該疾患の予防、治療に有効な食品又は飲料が提供される。とりわけ大腸がん、胃がん等消化器系のがんの場合、本発明の加熱処理物を食品、飲料として経口的に摂取することによりがん細胞の増殖抑制やがん細胞にアポトーシスを起こさせることができるため、本発明の加熱処理物を含有、添加及び/又は希釈してなる食品又は飲料は消化器系がんの治療、予防に優れた効果を有している。

また本発明の加熱処理物は抗ウイルス作用、抗菌作用を有し、抗ウイルス剤、抗菌剤、口内用剤、例えば歯磨剤、食品用又は飲料用防腐剤として有用であり、またその抗潰瘍作用により抗潰瘍剤、潰瘍の予防剤等としても有用である。更にその肝機能改善作用により肝機能改善剤としても有用である。

本発明により、食品又は飲料中に生理活性を有する本発明の加熱処理物を多量に含有させることが可能となった。本発明の加熱処理物が有する種々の生理活性、アポトーシス誘発作用、抗菌作用、制がん作用、抗ウイルス作用、血管新生抑制作用、異常増殖細胞の抑制作用、抗潰瘍作用、肝機能改善作用、食物繊維作用、鉄・重金属等の除去作用等によって、本発明の食品又は飲料は発がん予防、制がん効果、抗菌効果、抗ウイルス効果、抗潰瘍効果、便秘予防効果、肝機能改善効果、アルツハイマー予防効果、アポトーシス誘発作用等の生体の恒常性（ホメオスタシス）維持機能を有する健康食品又は飲料であり、本発明により、胃腸健康保持に有用な機能性物質入りの食品又は飲料が提供される。また、本発明の加熱

菌力を能便に増強することができ、本発明の加熱処理物は食品又は飲料の防腐剤としても極めて有用である。本発明の加熱処理物、特に分子量10000以下の

画分、好ましくは分子量500以下の画分はその種々の生理機能により、食品又は飲料に使用することにより、簡便に食品又は飲料に種々の生理機能を付与することができ、例えば食品又は飲料の抗菌付与用添加剤、食品用又は飲料用の防腐剤として極めて有用である。

更に本発明によれば制がん作用やアポトーシス誘発作用を有し、がん患者や、ウイルス性疾患において、病変細胞の増殖抑制や病変細胞にアポトーシスを誘発させることにより、該疾患の予防、治療に有効なアポトーシス誘発剤、及び制がん剤が提供される。とりわけ大腸がん、胃がん等消化器系のがんの場合、本発明の加熱処理物を食品、飲料として経口的に摂取することによりがん細胞の増殖抑制やがん細胞のアポトーシス誘発により、本発明の加熱処理物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は消化器系がんの治療、予防に優れた効果を有している。また本発明によれば抗潰瘍作用を有し、潰瘍患者において、該疾患の予防、治療に有効な抗潰瘍剤が提供される。消化器系の潰瘍の場合、本発明の加熱処理物を食品、飲料として経口的に摂取することにより抗潰瘍作用を発揮させることができるため、本発明の加熱処理物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は消化器系潰瘍の治療、予防に優れた効果を有している。本発明の薬剤は、食用果物果皮、食用海藻等を原料として安価に大量に供給可能であり、食品由来で安全性が高い点においても優れている。また、本発明により簡便なアポトーシス誘発方法が提供され、本発明の方法を使用することにより、アポトーシス機構解明の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等を行うことができる。

## 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は重量％を意味する。

### 実施例 1

リンゴ製ペクチン（和光純薬社製）500mgを120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液（pH7.0）50mlに懸濁し、121℃、2

0分間オートクレーブし、ペクチン加熱処理溶液を調製した。

56℃、30分間処理した牛胎児血清（ギブコ社製）を10%含むRPMI 1640培地（日水社製）にて37℃で培養したヒト前骨髄性白血病細胞HL-60（ATCC CRL-1964）をASF104培地（味の素社製）にて $5 \times 10^5$ 個/9mlとなるように懸濁した。

この懸濁液に対し、ペクチン加熱処理溶液を1ml添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で16時間培養した。また確認のためアポトーシスを誘発する試薬として知られているアクチノマイシンD（シグマ社製）の水溶液（0.1mg/ml）0.1ml及び生理食塩水0.9mlを前述のペクチン溶液の代りに用いて同様の培養を行った。

培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、ペクチン加熱処理溶液、アクチノマイシンD添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の生理食塩水1ml添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

この結果よりペクチン加熱処理溶液はHL-60細胞にアポトーシスを誘発することが明らかとなった。

## 実施例2

市販のリンゴ製ペクチンを終濃度10mg/mlとなるように120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液（pH7.0）に溶解し、1N NaOHでpH7.0に調整した。これらを121℃、30分間加熱処理し、紫外部吸収スペクトルを測定したところ、加熱処理したものでは加熱前に比べて235nm付近の吸光度が増大していた。

この試料を1N NaOHでpH7.0に調整し、アポトーシス誘発活性を実施例1の方法に従って測定した。但し、以下各実施例において、ASF104培

（ATCC CRL-240）を用い、各試料はアポトーシス誘発活性測定時に1N NaOHでpH7.0に調整し、そのアポトーシス誘発活性を測定した。

また、細胞懸濁液に2倍容の0.4%トリパンブルー水溶液を加えて光学顕微鏡で観察し、トリパンブルーを排出して無色の細胞を生細胞、青色に染色された細胞を死細胞として計数した。

その結果、ペクチン加熱処理物に顕著なHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性がみられた。

市販のレモン製ペクチンを120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液(pH7.0)に10mg/mlとなるように溶解するとpH5.0であった。これを121℃、30分間加熱処理したものの紫外吸収スペクトルを測定すると、加熱処理物では235nm付近の吸光度が増大していた。

この試料を1N NaOHでpH7.0に調整し、上記の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ、加熱処理物は顕著なアポトーシス誘発活性を示した。

その結果を図1に示す。すなわち図1はHL-60細胞の培養液にレモンペクチンの加熱処理物溶液を1mg/mlとなるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図1中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白ひし形印(◇)はレモンペクチン加熱処理物添加をそれぞれ示し、レモンペクチン加熱処理物は制がん作用を示した。

### 実施例3

(1)市販のリンゴ製ペクチンを120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液(pH7.0)に10mg/mlになるように溶解し、121℃で20分間加熱処理し、加熱処理液を調製し、その一部を凍結乾燥し、加熱処理液の凍結乾燥物を得た。

次に、加熱処理液の残部をセルロース透析膜(分画分子量12,000~14,000、三光純薬社製)又はスペクトラ/ボア7透析膜(分画分子量1,000、スペクトラム社製)を用いて純水に対して透析し、それぞれの透析内液を凍結乾燥して秤量したところ、どちらの透析内液の凍結乾燥物も加熱処理前のペクチン



に比べて約10%その重量が減少していた。

加熱処理液の凍結乾燥物を水に、透析内液の凍結乾燥物を120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液(pH7.0)にそれぞれ終濃度10mg/mlになるように溶解し、1N NaOHでpH7.0に調整し、実施例2の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定した。

加熱処理したペクチン溶液が活性を有していたのに対して透析した透析内液試料は活性が低下していた。

その結果を図2に示す。すなわち図2はHL-60細胞の培養液に加熱処理液の凍結乾燥物、セルロース透析膜内液の凍結乾燥物、スペクトラ/ポア7透析膜内液の凍結乾燥物をそれぞれ1mg/mlとなるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図2中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白ひし形印(◇)は加熱処理液の凍結乾燥物、白丸印(○)はセルロース透析膜内液の凍結乾燥物、白三角印(△)はスペクトラ/ポア7透析膜内液の凍結乾燥物の添加をそれぞれ示し、加熱処理液は制がん作用を示した。

(2) 上記加熱処理ペクチン溶液を1N NaOHでpH7.0に調整した後、セントリプラス10(分画分子量10,000、アミコン社製)を用いて限外ろ過し、通過画分を得た。この画分のアポトーシス誘発活性を実施例2の方法で測定したところ、限外ろ過前の試料と同等の活性を有していた。

その結果を図3に示す。すなわち図3はHL-60細胞の培養液に加熱処理ペクチン溶液のセントリプラス10通過画分を1mg/mlとなるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図3中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白ひし形印(◇)は通過画分添加を

加熱処理ペクチン溶液、通過画分は制がん作用を示した。

#### 実施例 4

市販のリンゴ製ペクチンを 120 mM NaCl を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に 10 mg/ml になるように溶解し、1 N NaOH で pH 7.0 に調整した後 121 °C で 30 分間加熱処理した。この試料 20 ml を純水で平衡化したセファクリル S-300 ハイロード 26/60 ハイレゾリューション カラム (ファルマシア社製) にアプライし、ゲルろ過を行った。移動相は純水で、流速は 1 ml/min に設定し、示差屈折計で検出した。

試料をカラムにアプライしてから 110 分から 190 分までに溶出してきたものを画分①、190 分から 270 分までに溶出してきたものを画分②、270 分から 400 分までに溶出してきたものを画分③として、それぞれエバポレーターで濃縮した。各々の画分に終濃度が 120 mM と 50 mM になるように NaCl と HEPES を加えて 20 ml とし、1 N NaOH で pH 7.0 に調整した。

実施例 2 の方法に従って HL-60 細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ最も低分子側の画分③に強い活性が認められた。

その結果を図 4 に示す。すなわち図 4 は HL-60 細胞の培養液に上記画分③を 1 mg/ml となるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間 (時間)、縦軸は培養液中の生細胞数 ( $\times 10^5$  コ/5 ml) を示す。図 4 中において白四角印 (□) は試料無添加 (対照)、白三角印 (△) は画分③の添加を示し、画分③は制がん作用を示した。

#### 実施例 5

(1) D- $\alpha$ -ガラクトツロン酸と D-グルクロン酸を各々 10 mg/ml になるように 120 mM NaCl を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、121 °C で 20 分間加熱処理した後 1 N NaOH で pH 7.0 に調整した。これらの試料の HL-60 細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例 2 の方法で測定したところ、ともに顕著な活性を示した。

その結果を図 5 に示す。すなわち図 5 は HL-60 細胞の培養液に加熱処理ガラクトツロン酸、加熱処理グルクロン酸をそれぞれ 1 mg/ml となるように添加

したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$  コ／5 ml）を示す。図5中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白ひし形印（◇）は加熱処理ガラクトロン酸、白丸印（○）は加熱処理グルクロン酸の添加をそれぞれ示し、各加熱処理物は制がん作用を示した。

（2）ガラクトロン酸を10 mg/mlになるように120 mM NaClを含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.0）に溶解し、1 N NaOHでpH 7.0に調整したもの及びpH 8.0に調整したものを121℃で20分間加熱処理し、各々のpHを1 N NaOHで7.0に調整した。これらの試料のHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例2の方法で測定したところ、pH 7.0で加熱処理した試料がpH 8.0で加熱処理した試料よりも強い活性を示した。

その結果を図6に示す。すなわち図6はHL-60細胞の培養液にpH 7.0加熱処理ガラクトロン酸、pH 8.0加熱処理ガラクトロン酸をそれぞれ1 mg/mlとなるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$  コ／5 ml）を示す。図6中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白ひし形印（◇）はpH 7.0加熱処理ガラクトロン酸、白丸印（○）はpH 8.0加熱処理ガラクトロン酸の添加をそれぞれ示し、pH 7.0加熱処理物は制がん作用を示した。

#### 実施例6

リンゴ製ペクチンを120 mM NaClを含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.0）に10 mg/mlになるように溶解し、121℃、20分間加熱処理して加熱試料①を得た。これを上記セルロース透析膜を用いて120 mM NaClを含む50 mM HEPES緩衝液（pH 7.0）に対して透析して透

過液を回収し、調整して加熱試料②を得た。

1 N NaOHでpH 7.0に調整した試料①～③を実施例2の方法に従って

HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ、試料①、③は活性を有し、試料②は活性が低下していた。

このことから透析によって活性が低下した加熱処理ペクチンの透析内液は、再度加熱処理することにより活性を回復することが明らかになった。

#### 実施例7

市販のリンゴ製ペクチンを1N HClに10mg/mlになるように溶解し、121℃で1.5時間加熱し、加熱処理物を調製した。次に該加熱処理物をNaOHでpH7.0に調整した後、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を次のように測定した。

56℃、30分間処理した牛胎児血清（ギブコ社製）を10%含むRPMI 1640培地（日水社製）にて37℃で培養したHL-60（ATCC CCL-240）をRPMI 1640培地にて $2.5 \times 10^5$ コ/4.5mlとなるように懸濁した。

この懸濁液4.5mlに対し、前記加熱処理物溶液を0.5ml添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で16時間培養した。また確認のためアポトーシスを誘発する試薬として知られているアクチノマイシンD（シグマ社製）の水溶液（0.1mg/ml）0.05ml及び生理食塩水0.45mlを前述の加熱処理物溶液の代りに用いて同様の培養を行った。

培養細胞を光学顕微鏡下で観察し、加熱処理物溶液、及びアクチノマイシンD添加培養細胞に核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお対照の生理食塩水0.5ml添加培養細胞においてはこれらの現象は認められなかった。

また、細胞懸濁液に2倍容の0.4%トリパンブルー水溶液を加えて光学顕微鏡で観察し、トリパンブルーを排出して無色の細胞を生細胞、青色に染色された細胞を死細胞として計数した。

その結果を図7に示す。すなわち図7はHL-60細胞の培養液にペクチンの

加熱処理物溶液を  $1 \text{ mg/ml}$  となるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$  コ/5 ml）を示す。図中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白ひし形印（◇）はペクチンの加熱処理物添加をそれぞれ示し、ペクチン加熱処理物は制がん作用を示した。

#### 実施例 8

市販のリンゴ製ペクチンを水に  $10 \text{ mg/ml}$  になるように溶解し、 $\text{NaOH}$  で  $\text{pH} 7.0$  に調整した後  $121^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱した。加熱処理後の  $\text{pH}$  は  $\text{pH} 4.5$  であった。次にこの加熱処理物を  $\text{NaOH}$  で再度  $\text{pH} 7.0$  に調整し、遠心（ $10,000 \times g$ 、10 分間）及び  $0.22 \mu\text{m}$  フィルターを用いたろ過によって不溶物を除いた後、等量のエタノールを加えて遠心（ $10,000 \times g$ 、10 分間）して得た上清画分と沈殿画分をそれぞれ減圧下濃縮乾固し、最初にペクチンを溶解した量の水に溶解した。エタノール処理の上清画分の水溶解液と沈殿画分の水溶解液を  $\text{NaOH}$  で  $\text{pH} 7.0$  に調整した後、それぞれを  $\text{HL-60}$  細胞培養液  $4.5 \text{ ml}$  に  $0.5 \text{ ml}$  添加してアポトーシス誘発活性を実施例 7 の方法で測定した。

その結果、 $\text{HL-60}$  細胞に対するアポトーシス誘発活性は上清画分に存在することが明らかになった。エタノールの代りに 2-プロピルアルコールを用いても同様の結果であった。その結果を図 8 に示す。すなわち図 8 は  $\text{HL-60}$  細胞の培養液にエタノール処理後、又は 2-プロピルアルコール処理後の上清画分の水溶解液又は沈殿画分の水溶解液を添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$  コ/5 ml）を示す。図中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白丸印（○）はエタノール処理沈殿画分添加、黒丸印（●）はエタノール処理上清画分添加、白三角印（△）は 2-プロピルアルコール処理沈殿画分添加、

溶媒処理上清画分は制がん作用を示した。

ペクチンの加熱処理物に添加するエタノール又は2-プロピルアルコールの量を0.5倍量、1.5倍量、及び2倍量にして上記と同様の方法で試料を調製したところ、等量のエタノール又は2-プロピルアルコールを加えた場合と同様に活性は上清画分にあった。但し、アポトーシス誘発活性は以下の方法で測定した。すなわち、96穴マイクロタイタープレートの各ウェルに5,000個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地100 $\mu$ l、試料10 $\mu$ l、及びアラマーブルー（アラマーバイオサイエンス社製）10 $\mu$ lを添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で48時間培養した後の560nmでの吸光度から590nmでの吸光度を引いた値を測定し、これを細胞の増殖度とした。

#### 実施例9

市販のリンゴ製ペクチンを10mg/mlになるように0.1M炭酸緩衝液に溶解し、pHを9.5に調整した。これを121℃で30分間加熱処理した。加熱処理物のpHはpH9.2であった。次にこの加熱処理物の一部をHClでpH7.0に調整し（試料A）、残部をpH4.5に調整した。pH4.5に調整した試料を再度121℃で30分間加熱処理し、次にpHを7.0に調整した（試料B）。試料A、試料BのHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を実施例7の方法で測定したところ、試料Aは活性を持たなかったが、試料B（ペクチン加熱処理液II）は活性を有していた。

その結果を図9に示す。すなわち図9はHL-60細胞の培養液に試料A又は試料Bを1mg/mlになるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$ コ/5ml）を示す。図中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白ひし形印（◇）は試料A添加、白丸印（○）は試料B添加をそれぞれ示し、ペクチン加熱処理液は制がん作用を示した。

#### 実施例10

(1) D- $\alpha$ -ガラクトロン酸を10mg/mlになるように水に溶解するとpH2.4であった。これを121℃で20分間加熱した。加熱処理物のpHはpH

H2.2であった。この加熱処理物のpHをNaOHでpH7.0に調整し、実施例7の方法、但しHL-60細胞が $3 \times 10^5$ コ/4.5mlとなるように調整した細胞懸濁液を使用し、HL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ本試料は活性を有していた。

この結果を図10に示す。すなわち図10はHL-60細胞の培養液にガラクトロン酸の酸性下加熱処理物を1mg/mlになるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白ひし形印(◇)はガラクトロン酸加熱処理物添加をそれぞれ示し、加熱処理物は制がん作用を示した。

(2) D-グルクロン酸を10mg/mlになるように120mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液(pH7.0)に溶解したところ、pH3.18であった。これを121℃で20分間加熱した後、加熱処理物のpHをNaOHでpH7.0に調整し、実施例7の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ本試料は活性を有していた。

この結果を図11に示す。すなわち図11はHL-60細胞の培養液にグルクロン酸の加熱処理物を1mg/mlになるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白丸印(○)はグルクロン酸加熱処理物添加をそれぞれ示し、クロン酸加熱処理物は制がん作用を示した。

#### 実施例11

D- $\alpha$ -ガラクトツロン酸を1%となるように水に溶解するとpH2.4であった。この溶解液を121℃で20分間加熱したところ、この加熱処理物のpHは

2.4であった。

この加熱処理物を、逆相S型(PALPAK-10,  $\mu$ -PS)カラム(4.6 $\times$ 250mm)(宝精造社製)を用いたHPLCに供した。流速は1ml/分、最初の30分は90%

アセトニトリル水溶液、その後20分かけて80%アセトニトリル水溶液から50%アセトニトリル水溶液の直線濃度勾配によって、ガラクトロン酸酸性下加熱処理物の分離を行った。90秒ごとにフラクションを行い、各フラクションを減圧下濃縮乾固した後、80 $\mu$ lの水に溶解し、そのうち10 $\mu$ lを用いてHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を以下に記載のMTT法で測定した。

その結果、溶出時間が4.5~12分と45~48分の2画分に活性が見られた。

MTT法：各被検液の希釈液5 $\mu$ l又は水5 $\mu$ lをそれぞれ96穴マイクロタイタープレートのウェルに入れる。そこに5000個のHL-60細胞を含む10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地100 $\mu$ lを加え、5%炭酸ガス存在下、37℃で48時間培養する。5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT; シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10 $\mu$ lを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察する。また、0.04N HCl含有2-プロピルアルコール100 $\mu$ lを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とする。

## 実施例12

(1) 市販のリンゴ製ペクチンを2.5%になるように水に懸濁し、次いでNaOHでpH7.0に調整した後、分画分子量12000~14000の透析チューブに入れ、15倍量の水で4回透析した。透析後、再度pH7.0に調整し、次いで121℃で1時間加熱し、加熱処理液を調製した。この加熱処理液のpHはpH5.4であった。この加熱処理液をNaOHでpH7.0に調整し、遠心処理によって不溶物を除去した後、0.8 $\mu$ mフィルター、0.45 $\mu$ mフィルター、0.22 $\mu$ mフィルターの順でフィルター処理を行い、フィルター処理液を調製した。次いでこのフィルター処理液を分画分子量10000の限外ろ過膜でろ過した。次に、この限外ろ過膜ろ液を減圧下濃縮乾固し、乾固物を最初にベ



クチンを懸濁したときの1/40量の水に溶解し、ペクチン加熱処理物溶液を調製した。

このペクチン加熱処理液を、水で平衡化したトヨパールHW-40Cカラム(4.4×92cm;東ソー社製)にアブライして、流速2.5ml/分でゲルろ過を行い、各画分のアポトーシス誘発活性を実施例8に記載のアラマーブルーを用いる方法で測定した。その結果、溶出時間448~472分の間に溶出してきた画分が活性を示した。

(2) D-α-ガラクトロン酸を1%になるように水に溶解し、NaOHでpH7.0に調整した。これを121℃で20分間加熱し、加熱処理液を実施例7の方法でHL-60細胞に対するアポトーシス誘発活性を測定したところ、加熱処理物はアポトーシス誘発活性を示した。

### 実施例13

ペクチン(和光純薬工業株式会社製 code 167-00542)、アルギン酸(非膨潤型:和光純薬工業株式会社製 code 011-13341)、D-α-ガラクトロン酸(ナカライテスク製 code 165-18)、及びD-グルクロン酸(ナカライテスク製 code 169-28)をそれぞれ1%になるように蒸留水に溶解し、各溶液を調製した。更に、ペクチンは、1N 酢酸水溶液に溶解した溶液も調製した。

次に、これらの1%溶解液を、30分、1時間、2時間、4時間、16時間、121℃で加熱処理を行った。各々の加熱処理物をNaOHでpH7に調整した後、0.22μmのフィルター滅菌を行い、アポトーシス誘発活性の測定試料を調製した。

これらの試料の2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍希釈液を調製し、そのアポトーシス誘発活性を実施例11に記載のMTT法でアッセイし、活

(A) ペクチンの1%水溶液のpHはpH3.4であった。ペクチン加熱処理

物の活性は活性が認められた最大希釈倍率で示した。表 1 に示すように、120℃、4 時間の加熱処理で、活性が顕著に増加した。

表 1 ペクチン水溶液の加熱処理

加熱時間	加熱前 pH	加熱後 pH	調整後 pH	活 性 (最大希釈倍率)
2 時間	3.4	3.3	7.0	2 倍
4 時間	3.4	3.2	7.2	10 倍
16 時間	3.4	3.5	7.0	20 倍

(B) ペクチンの 1%酢酸溶液の pH は pH 2.6 であった。ペクチン酢酸溶液の加熱処理物の活性は活性が認められた最大希釈倍率で示した。表 2 に示すように、120℃、16 時間の加熱処理で、活性が顕著に増加した。

表 2 ペクチン酢酸溶液の加熱処理

加熱時間	加熱前 pH	加熱後 pH	調整後 pH	活 性 (最大希釈倍率)
2 時間	2.6	2.7	7.0	2 倍
4 時間	2.6	2.6	7.2	5 倍
16 時間	2.6	2.8	7.1	20 倍

(C) ガラクツロン酸水溶液の加熱前の pH は pH 2.5 であった。ガラクトツロン酸加熱処理物の活性は活性が認められた最大希釈倍率で示した。表 3 に示す

ように、120℃、1時間の加熱処理で、活性が顕著に増加した。

表3 ガラクツロン酸水溶液の加熱処理

加熱時間	加熱前pH	加熱後pH	調整後pH	活 性 (最大希釈倍率)
30分	2.5	2.4	6.8	2倍
1時間	2.5	2.4	6.9	10倍
2時間	2.5	2.4	6.9	20倍
4時間	2.5	2.4	6.8	50倍
16時間	2.5	2.6	6.9	100倍

(D) グルクロン酸水溶液の加熱前のpHはpH2.4であった。グルクロン酸加熱処理物の活性は活性が認められた最大希釈倍率で示した。表4に示すように、120℃、30分の加熱処理で、活性が顕著に増加した。

表4 グルクロン酸水溶液の加熱処理

加熱時間	加熱前pH	加熱後pH	調整後pH	活 性 (最大希釈倍率)
30分	2.4	2.6	6.9	10倍
1時間	2.4	2.7	6.9	20倍
2時間	2.4	2.7	6.9	50倍
4時間	2.4	2.7	6.9	50倍
16時間	2.4	2.8	7.0	100倍

(E) アルギン酸水溶液の加熱前のpHはpH3.3であった。アルギン酸加熱処理物の活性は活性が認められた最大希釈倍率で示した。表5に示すように、120℃、2時間の加熱処理で、活性が顕著に増加した。

表5 アルギン酸水溶液の加熱処理

加熱時間	加熱前pH	加熱後pH	調整後pH	活 性 (最大希釈倍率)
1 時間	3.3	2.6	6.8	2 倍
2 時間	3.3	2.5	6.9	10 倍
4 時間	3.3	2.7	7.0	10 倍
16 時間	3.3	2.9	7.3	20 倍

#### 実施例14

エタノール洗浄 (80%エタノール洗浄 → 50%エタノール洗浄 → 80%エタノール洗浄 → 100%エタノール洗浄 → 減圧乾燥 → 粉末の粗精製ベクチン) したベクチン (和光純薬社製 code 167-00542)、未洗浄ベクチン (和光純薬社製 code 167-00542)、アルギン酸 (非膨潤型: D-マンヌロン酸型: 和光純薬社製 code 011-13341)、アルギン酸 (膨潤型: L-グルロン酸型: 和光純薬社製 code 014-13331)、D-グルクロン酸 (ナカライテスク社製 code 169-28)、D-α-ガラクトuron酸 (ナカライテスク社製 code 165-18) を0.5gずつ10本 (1本は未加熱のコントロール) の試験管に入れ、空气中で、120℃、150℃、180℃の3条件で、試料の色の変化を観察しながら乾熱を行い、色の変化に合わせて、3点でサンプリングし、以下の方法で活性成分を抽出した。

乾熱試料を12.5mlの50%エタノールに懸濁した。懸濁液を16時間室温で振とうした後、遠心分離して、抽出液を得た。この抽出液を濃縮乾固し、最初の試料換算で、1%濃度になるように蒸留水に再溶解した。溶解液のpHを7付近に調整し、0.22 $\mu$ mフィルトレーション滅菌して、活性測定用の試料とした。これらの試料を用い、実施例11に記載のMTT法で活性のアッセイを行った。その結果を乾熱温度、時間、再溶解時のpH、調整後のpHと共に表6～表11に示した。なお、未加熱の試料についても同様の操作を行ったところ、活性は認められなかった。なお表6～11において活性は活性を示した試料の希釈倍数を示す。

このことより、乾熱処理によっても活性物質が産生されることが明らかになった。

表6 EtOH洗浄(washed)ペクチンの加熱処理

乾熱温度(℃)	時間(分)	再溶解時のpH	調整後のpH	活性 (希釈倍数)
180	60	3.7	6.9	1
180	120	3.5	6.8	1

表7 ペクチンの加熱処理

乾熱温度(℃)	時間(分)	再溶解時のpH	調整後のpH	活性 (希釈倍数)
180	120	3.9	7.0	1

表8 アルギン酸（D-マンヌロン酸型）の加熱処理

乾熱温度（℃）	時間（分）	再溶解時の pH	調整後の pH	活 性 （希釈倍数）
150	40	3.0	6.8	1
150	60	3.0	6.8	1
180	20	3.0	6.8	1
180	30	3.0	6.8	1
180	40	3.1	6.9	1

表9 アルギン酸（L-グルロン酸型）の加熱処理

乾熱温度（℃）	時間（分）	再溶解時の pH	調整後の pH	活 性 （希釈倍数）
150	60	3.3	6.7	1
180	20	3.3	6.7	1
180	30	3.3	6.7	1
180	40	3.2	6.8	1

表 1 0 グルクロン酸の加熱処理

乾熱温度 (°C)	時間 (分)	再溶解時の pH	調整後の pH	活 性 (希釈倍数)
150	20	3.2	6.8	1
150	30	3.3	6.9	1
150	40	3.3	6.9	1
180	10	3.1	7.0	1
180	20	3.3	6.8	1
180	30	3.3	6.9	2

表 1 1 ガラクツロン酸の加熱処理

乾熱温度 (°C)	時間 (分)	再溶解時の pH	調整後の pH	活 性 (希釈倍数)
120	60	2.9	6.9	1
120	120	2.9	6.9	1
150	20	2.9	6.8	2
150	30	2.9	6.9	2
150	40	2.9	6.8	2
180	10	2.9	7.1	2
180	20	2.9	6.8	2
180	30	2.9	6.8	1

実施例 15

市販のリンゴ製ペクチンを1%になるように水に溶解し、還流冷却器を取り付けたナス型フラスコに入れて110~120℃に設定した油浴中18時間、42時間、及び66時間加熱した。加熱中のペクチン溶液の温度は100~102℃であった。

上記ペクチン溶液を遠心して沈殿を除き、その上清を3倍及び10倍に水で希釈した試料を調製した。希釈した試料10 $\mu$ lと5000個のHL-60細胞を含む10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地100 $\mu$ lを96穴マイクロタイタープレートのウェルに添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で48時間培養後、実施例11に記載のMTT法で活性を測定した。

その結果、18時間加熱ペクチンの3倍希釈液添加区分、42時間及び66時間加熱ペクチンの3倍、10倍希釈液添加区分において生細胞は観察されず、これらの希釈液濃度において100℃加熱ペクチンは活性を示した。

一方、18時間加熱ペクチンの10倍希釈液添加区分ではほぼすべての細胞が生細胞であったが、対照の水添加区分と比べて590nmにおける吸光度は低かった。

#### 実施例16

ポモシンペクチンLM-13CG（ハーキュリーズ社製）5kgを水道水100リットルに添加し、液温28℃から液温120℃となるまで水蒸気吹き込みにより35分間昇温させ、次いでかくはん下で120℃、5時間保温し、次いで冷却し、冷却物135リットルを調製した。次いで冷却物にろ過助剤として、セライト#545（セライト社製）1.35kg、及びシリカ#600-S（中央シリカ社製）1.35kgを添加し、次いでセライト#545の0.1kg、及びシリカ#600-Sの0.1kgでプレコートしたコンパクトフィルター（6インチ16段ろ紙：ADVANTEC#327）でろ過を行った。得られたろ液はプレートヒーター（日阪製作所製）による連続瞬間加熱処理（98℃、60秒）を行った後冷却し、150リットルのペクチン加熱処理液Iを調製した。

ペクチン加熱処理液IのpHは約3.5、酸度は6.2ml、糖度は5.8Brix%であった。なおpHはpHメーターで測定し、酸度は試料10mlをp



H7.0に中和するのに要する0.1N NaOH量(ml)で表示した。更に糖度はブリックス糖度計で測定した。

本ベクチン加熱処理液Iの、ヒト前骨髄性白血病細胞HL-60細胞に対する活性を次のようにして測定した。

56℃、30分間処理した牛胎児血清(ギブコ社製)を10%含むRPMI 1640培地(日水社製)にて37℃で培養したHL-60(ATCC CRL-240)を上記培地にて $2.5 \times 10^5$ コ/4.5mlとなるように懸濁した。この懸濁液4.5mlに対して、20mg/ml、10mg/ml、5mg/ml、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.2mg/ml、0.1mg/mlになるように水で希釈した上記加熱ベクチン溶液を0.5ml添加し、37℃、5%二酸化炭素存在下で24時間及び48時間培養した。

細胞培養液にトリパンブルー水溶液を加えて数分間室温で放置した後光学顕微鏡で観察し、トリパンブルーを排除して無色の細胞を生細胞、青色に染色された細胞を死細胞として計数した。また培養細胞を光学顕微鏡で観察し、1mg/ml以上の加熱ベクチンを添加した区分において核の凝縮、細胞の縮小、アポトーシス小体の形成をそれぞれ確認した。なお0.5mg/ml以下の加熱ベクチンを添加した区分と対照の水0.5ml添加区分においてはこれらの現象は認められなかった。

その結果を図12に示す。すなわち図12はHL-60細胞の培養液に様々な濃度の加熱ベクチンを添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$ コ/5ml)を示す。図中において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白逆三角印(▽)は2mg/ml加熱ベクチン添加、黒四角印(■)は1mg/ml加熱ベクチン添加、黒ひし形印(◆)は0.5mg/ml加熱ベクチン添加、黒丸印(●)は0.2mg/ml加熱ベクチン添加、黒三角印(▲)は0.1mg/ml

白逆三角印(▽)の2mg/ml加熱ベクチン添加と同様な活性を示し、加熱ベクチン1mg/ml以上の添加で制がん作用が認められた。

## 実施例 17

市販のD-グルクロン酸（シグマ社製 G5269）を1%になるように水に溶解して121℃で4時間加熱し、NaOHでpH7.0に中和した後、水で10倍、40倍、80倍、160倍に希釈した液を作製した。2.5×10<sup>5</sup>個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地4.5mlに0.5mlのグルクロン酸加熱物希釈液を添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で24時間培養した後、実施例7の方法で細胞増殖抑制活性として制がん活性を測定した。その結果、10～80倍希釈液添加区分では細胞数と細胞生存率の低下が見られた。また、40～80倍希釈液添加区分ではDNAの低分子化が見られた。なお、細胞生存率R(%)は下記式で計算した。

$$R = V_s / (V_s + D_s) \times 100 + D_c / (V_c + D_c) \times 100$$

なお、式中でV<sub>s</sub>、D<sub>s</sub>はそれぞれ試料添加時の生細胞数と死細胞数、V<sub>c</sub>、D<sub>c</sub>はそれぞれ水添加時の生細胞数と死細胞数を示す。Rの値が50%になる培地1ml中の制がん活性が1単位となる。

得られた細胞生存率をグルクロン酸加熱物の希釈倍率の常用対数値に対してプロットすると各点は1本の直線上に乗り、グルクロン酸加熱物での生存率R(%)は下記式で算出される。

$$R = 58.656X - 31.884$$

〔式中Xはグルクロン酸加熱物の希釈倍率である〕

この直線から、グルクロン酸加熱物の非希釈物は250単位/mlに相当することが明らかになった。

その結果を図13に示す。すなわち図13はHL-60細胞に様々な希釈倍率のグルクロン酸加熱物を添加し、24時間培養したときの希釈倍率と細胞生存率の関係を示す図であり、横軸は希釈倍率（倍、対数値）、縦軸は細胞生存率(%)を示す。

## 実施例 18

(1) リンゴ剥皮ピューレ (丸善食品工業社製)、バナナピューレ (小川香料社製)、青ジソエキス 1/4 (ダンフーズ社製)、パンプキンエキス 60 (ダンフーズ社製)、パンプキンミンチ (ダンフーズ社製)、セロリピューレ (ダンフーズ社製)、ゴボウピューレ (ダンフーズ社製)、エシャロットエキス 60 (ダンフーズ社製) の各 25% 溶液を調製し、121℃、40 分の加熱処理を行った。又同様に各 25% 溶液を調製し 121℃、4 時間の加熱処理を行った。各処理液は冷却後、ろ過を行い、各加熱処理溶液を調製した。

121℃、20 分加熱処理物の糖度、pH を表 12 に示す。

表 12

原料	糖度 (Brix)	pH
リンゴ剥皮ピューレ	3.6	3.6
バナナピューレ	6.0	5.9
青ジソエキス 1/4	2.2	5.8
パンプキンエキス 60	16.8	5.3
パンプキンミンチ	4.0	5.7
セロリピューレ	1.6	5.5
ゴボウピューレ	2.4	5.8
エシャロットエキス 60	15.6	4.9

表 1 3

原料	糖度 ( B r i x )	p H
リンゴ剥皮ピューレ	3. 6	3. 6
バナナピューレ	5. 5	4. 6
青ジソエクス 1 / 4	2. 5	5. 3
パンプキンエクス 6 0	1 6. 6	4. 7
パンプキンミンチ	3. 0	5. 0
セロリピューレ	1. 6	4. 9
ゴボウピューレ	2. 5	4. 8
エシャロットエクス 6 0	1 3. 8	4. 3

各加熱処理液は分子量分画 1 万以下の画分に実施例 1 7 記載の制がん活性が確認された。

次に糖度 ( B r i x ) 値を 1 に濃度調整し、各加熱処理液の官能検査を行った。各加熱処理液共に食品用又は飲料用として良好な官能を示した。

( 2 ) バナナピューレ、リンゴピューレ、セロリピューレの各々 2 5 % 水溶液の 1 2 1 ° C、4 時間加熱処理物を代表例とし、実施例 1 7 記載の方法に準じ各加熱処理物の制がん活性単位を測定した。その結果を表 1 4 に示す。加熱処理により制がん活性物質が各処理液で生成した。

表 1 4

ピューレの種類	活性 (単位/ml)
バナナピューレ	23.4
リンゴピューレ	9.5
セロリピューレ	0.5

## 実施例 19

①大根葉、②人参葉、③人参、④キャベツ、⑤ナスの皮を除いた中身、⑥バナナ及び⑦ハッサクのアルベド各々40gに160mlの水を加えてミキサーでホモジナイズした。この一部を121℃で4時間加熱した後遠心し、その上清をNaOHでpH6に調整した物を試料A、残りをHClでpH3に調整した後121℃で4時間加熱し、その遠心上清をNaOHでpH6に調整した物を試料Bとした。

①～⑦から調整した各試料A、Bを希釈し、希釈液10 $\mu$ lを用い、制がん活性を実施例11記載のMTT法で測定した。その結果を表15に示す。なお、表15に示す数値は活性が観察される希釈倍率であり、－は非希釈液添加区分で活性が観察されないことを示す。各果物、野菜においてその加熱処理物に活性の生成が認められた。なお表中において希釈倍数は完全に細胞が死滅した希釈倍数、括弧内の数字は細胞に影響の出た希釈倍数を示す。

表 15

野菜、果物の種類	活性希釈倍数	
	試料 A	試料 B
大根葉	1 (4)	2 (4)
人参葉	—	1
人参	2 (4)	1 (2)
キャベツ	1 (4)	1
ナス	1 (2)	1
バナナ	2 (4)	2 (4)
ハッサク	4 (8)	4 (8)

## 実施例 20

非膨潤性アルギン酸（和光純薬社製、011-13341）及び膨潤性アルギン酸（和光純薬社製、014-13331）を 1 % になるように水に懸濁したところ、pH はそれぞれ 3.32 と 3.38 であった。これらを 121℃ で 20 分間加熱し、実施例 7 の方法で HL-60 細胞に対する細胞増殖抑制活性として、その制がん活性を測定した。但し、培養開始時の HL-60 細胞数は  $3 \times 10^5$  個 / 5 ml とした。

その結果を図 14 に示す。すなわち図 14 は HL-60 細胞の培養液に非膨潤性アルギン酸及びアルギン酸、膨潤性アルギン酸の加熱処理物溶液を 1 mg / ml になるように添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数（ $\times 10^5$  個 / 5 ml）を示す。図中において白四角印（□）は試料無添加（対照）、白菱形印（◇）は非膨潤性アルギン酸加熱処理物添加、白三角印（△）は膨潤性アルギン酸加熱処理物添加をそれぞれ示す。

非膨潤性アルギン酸加熱処理物に高活性が認められた。

#### 実施例 2 1

アルギニックアシッドHFD（大日本製薬社製）の1%の水懸濁溶液を調製し、120℃、4時間の加熱処理を行った。加熱処理液の遠心上清物について実施例17記載の方法で制がん活性を測定し、制がん活性単位を算出した。結果を表16に示す。アルギン酸加熱処理物に活性物質の生成が認められた。

表 1 6

加熱処理物	活性（単位／ml）
アルギニックアシッドHFD	
1%溶液加熱物	83.3

#### 実施例 2 2

アルギニックアシッドHFD（大日本製薬社製）1gを50mlの水に懸濁し、各30分、1時間、2時間、14時間、121℃で加熱処理した。各加熱処理物の溶液を遠心分離法で調製し、その分子量を測定した。なお分子量測定は下記条件下で行った。

ガードカラム：TSKガードカラムPWH

カラム：TSKゲル G3000PW

溶出剤：0.2M NaCl

検出：210nmの吸収

加熱時間2時間では分子量1200、630を、加熱時間4時間では1200、630、加熱時間14時間では分子量620、400を各々主要ピークとす

る低分子分解物が生成しており、同時に低分子分解物も生成していた。なお分子量1万以上の高分子は含有されず、制がん活性、抗菌活性は分子量500以下の画分に認められた。

### 実施例23

(1) 市販のグルクロノラクトン(メルク社製 code No. 100282)を1%になるように水に溶解し、121℃で0.5時間、1時間、2時間、4時間または16時間加熱した。本加熱処理液の制がん活性を実施例17の方法に従って測定した。加熱時間0.5時間で制がん活性物質の生成が認められ、制がん活性物質の生成は加熱時間を長くするに従って増加し、加熱時間4時間、16時間でそれぞれ加熱時間0.5時間の約10倍となった。

(2) 上記グルクロノラクトンを0.1%、1%、2%、5%、10%、または20%になるように水に溶解し、121℃で4時間加熱した。本加熱処理液の制がん活性を実施例17の方法に従って測定した。いずれの濃度においても制がん活性物質の生成が認められたが、使用したグルクロノラクトン当たりの加熱処理物の制がん活性の強度は、0.1%グルクロノラクトン水溶液を用いた場合が最も強かった。

(3) 上記グルクロノラクトンの1%水溶液のpHをHClまたはNaOHで1、2、3、または4.5に調整し、121℃で4時間加熱した。本加熱処理液の制がん活性を実施例17の方法に従って測定した。グルクロノラクトンの加熱処理による制がん活性物質の生成は各pHで認められたが、使用したグルクロノラクトン当たりの加熱処理物の制がん活性の強度はpH3から4.5でpH1の約15倍を示した。

(4) 市販のD-グルクロン酸(シグマ社製 G5269)を1%になるように水に溶解し、121℃で4時間加熱し、pH未調整の試料(pH2.6)とNaOHでpH6.6に調整した試料を調製した。各々を1mlずつ分注し、-20℃、4℃、37℃で保存した後、制がん活性を実施例17の方法に従って測定した。

その結果、25日間保存後では、37℃で保存した場合に加熱処理物の制がん



活性はやや減少していたが、4℃、-20℃ではほぼ安定であった。

#### 実施例24

ボモシンペクチンタイプLM-13CG（ハーキュリーズ社製）、アルギニックアシッドHFD（大日本製薬社製）、D-グルクロン酸（ナカライテスク社製）及びグルクロノラクトン（メルク社製）を1%となるように水に溶解、又は懸濁し、95℃、121℃又は132℃で16時間加熱した。この加熱処理物の制がん活性単位を実施例17の方法で測定した。その結果を表17に示す。

表 1 7

加熱処理物	加熱温度 (℃)	活 性 (単位/ml)
ペクチン	95	1.2
	121	32.3
	132	1.4
アルギン酸	95	1.0
	121	57.8
	132	25.7
グルクロン酸	95	40.8
	121	345
	132	30.2
グルクロノ ラクトン	95	42.7
	121	5376
	132	33.8

## 実施例 25

(1) 1.5g のリンゴペクチン (和光純薬社製) を 100ml の水に懸濁し、NaOH で pH 12 に調整した。NaOH を徐々に添加して pH を 12 に保ちながら 4℃ で攪拌した。8 時間経過後からは pH の降下は見られなかった。24 時間経過後 HCl で pH 5 に調整し、4 倍容のエタノールを加え、4℃ で 1 時間攪拌後濾紙で濾過した。沈殿を 65% エタノールに続いて 99.5% エタノールで洗浄し、減圧下乾燥したところ 1.32g のペクチン酸を得た。

(2) 上記(1)で得られたペクチン酸200mgを200mlの水に溶解し、濃塩酸2mlを徐々に加えた。80℃で66時間加熱後、20000×gで30分間遠心し、上清と沈殿を得た。上清をNaOHでpH7に調整し、分画分子量1000の透析膜で水に対して透析した後凍結乾燥して18.4mgの酸可溶性画分を得た。沈殿を30mlの水に懸濁し、NaOHでpH6に調整し、分画分子量1000の透析膜で水に対して透析した後凍結乾燥して114mgの酸不溶性画分を得た。

(3) 上記(2)で得られた酸可溶性画分と酸不溶性画分をそれぞれ1%になるように水に溶解し、HClでpH3に調整した後、121℃で20分間加熱した。これらの加熱処理物の制がん活性を実施例2のアラマーブルーを用いる方法で細胞増殖抑制活性として測定した。その結果、酸可溶性画分加熱処理物に制がん活性が見られた。

#### 実施例26

(A) D-グルクロン酸(ナカライテスク製 code 169-28)を蒸留水に1%になるように溶解し、120℃で一晩加熱した後、pHを7付近にNaOHで調整した。このグルクロン酸加熱物を用いて抗菌活性を下記の様に検討した。

被検菌をL-ブロス(1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、5% NaCl pH 7.0)で、一晩種培養した。5mlのL-ブロスに50μl、100μl、250μl、500μl、1000μlのグルクロン酸加熱物を添加した培地及び何も添加していない培地に5μlの種培養液を植菌し、37℃で振とう培養し生育を測定した。培養開始時と8時間後に、富士デジタル濁度計(販売元 富士工業株式会社、製造元 秋山電機製作所)を用い、調整目盛を82.3の条件で培養物の濁度を測定し、8時間後の濁度の値から培養開始時の濁度の値を引いた値(生育濁度)で被検菌の生育を測定し

た。

培地としてL-ブロス培地を使用した。

被検菌としてはエシェリヒア コリ(Escherichia coli) HB101(ATCC 33694

：被検菌①）、サルモネラ ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) LT-2 (ATCC 27106：被検菌②)、シュエドモナス アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) (IFO 3080：被検菌③)、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*) 3A (NCTC 8319：被検菌④)、バチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) (IFO 3034：被検菌⑤)、ストレプトコッカス ミュータンス (*Streptococcus mutans*) GS5 (国立予防衛生研究所保存株：被検菌⑥)を使用した。

表 18

生育濁度					
加熱処理物添加量 ( $\mu\text{l}/5\text{ml}$ 培地)					
被検菌	0	50	100	250	500
①	238	183	89	6	10
②	247	177	36	5	11
③	273	262	212	237	61
④	285	251	247	20	11
⑤	280	258	205	73	13
⑥	140	136	131	125	10

各被検菌に対し加熱処理物は100～500 $\mu\text{l}/5\text{ml}$ の添加のいずれかで抗菌活性を示した。なお加熱処理物はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン生産性黄色ブドウ球菌、嘔吐型のバチルス セレウス、下痢型のバチルス セレウス、腸出血性大腸菌O-157にも抗菌活性を示した。

(B) 食品添加用アルギン酸 (アルギニック アシッド HFD：大日本製薬株式会社製) を蒸留水に1% になるように溶解し、120℃で一晩加熱した後、pHを7付近にNaOHで調節した。このアルギン酸加熱物を用いて上記の方法に順じ、加熱処理液を250～1000 $\mu\text{l}$ 添加し、被検菌①～⑥への抗菌活性を検討した。なお被検菌⑥の場合は1500 $\mu\text{l}$ まで添加した。その結果を表19に示す。

表 19

被検菌	生育濁度				
	加熱処理物添加量 ( $\mu\text{l}/5\text{ml}$ 培地)				
	0	250	500	1000	1500
①	239	30	8	13	—
②	247	10	8	12	—
③	273	233	188	30	—
④	285	222	12	15	—
⑤	280	158	22	13	—
⑥	140	138	130	101	12

各被検菌に対し加熱処理物は250～1500 $\mu\text{l}/5\text{ml}$ の添加のいずれかで抗菌活性を示した。なお加熱処理物はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌、エンテロトキシン生産性黄色ブドウ球菌、嘔吐型のバチルス セレウス、下痢型のバチルス セレウス、腸出血性大腸菌O-157にも抗菌活性を示した。

#### 実施例27

市販のリンゴ製ペクチン5gを、200mM NaClの500mlに溶解し、NaOHでpH7.0に調整した。これを121℃で30分間加熱処理後、更にNaOHでpH7.0に再調整した。12,000rpm (約10,000 $\times g$ )で30分間遠心分離を行い、得られた上清(本試料)の制がん作用を調べた。

マウス固形がんMethA ( $4 \times 10^6$  細胞/マウス)を、10週齢のBALB/cマウス(メス、体重約20g)の腹部に皮下注射した。その後、引き続いて同じ箇所に10日間連続して本試料(100mg/kg/日)を皮下注射した。

一方コントロール群には、本試料の代りに生理食塩水を同様に皮下注射した。2週間後にマウス腹部に形成された固形がん組織を摘出して、その重量を測定し

た。コントロール群では、平均重量が1.88gであったのに対し、本試料投与群においては、0.88gであり、約30.1%のがん抑制率を示し、本試料に制がん作用が認められた。

表 2 0

	摘出がん重量 (g)	抑制率 (%)
コントロール群	1.23 1.21 1.34 1.52 1.74 1.15 1.09 0.76 平均 1.26 ± 0.10	0 %
本試料投与群	1.69 1.61 0.33 0.14 0.17 0.99 1.21 平均 0.88 ± 0.25	30.1 %

## 実施例 28

マウス白血病細胞株 P-388 ( $1 \times 10^6$  細胞/ml) を、実施例 27 で調製した本試料 (1 mg/ml) と共に 10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 6 時間 イン ビトロ (in vitro) で培養した後、5 週齢の DB

A/2マウス(メス、体重約20g)にそのまま1ml/マウスを腹腔内に注射した(P-388:  $1 \times 10^6$  細胞/マウス、本試料: 50mg/kg)。

一方コントロール群マウスには、本試料の代りに生理食塩水と共に、同様の条件で培養したP-388を注射した。

それぞれ8匹ずつの2群において、マウスの生存数、平均生存日数、延命率を算定した。結果を図15に示した。すなわち図15は本試料の白血病細胞に対する制がん作用を示す図であり、縦軸はマウスの生存数、横軸は生存日数を示す。図中、破線はコントロール群を、実線は本試料投与群を示している。すなわちコントロール群では平均生存日数が8.0日であったが、本試料投与群においては平均生存日数は14.6日であり、その延命率は182.5%を示し、本試料に有意な延命効果が認められた。

なお、同時に並行して行った実験で、6時間インビトロで培養した後のP-388細胞の生存率は本試料の添加、無添加の両処理とも差がなく、細胞生存率は各100%であった。

## 実施例29

ガラクツロン酸又はグルクロン酸を各々50mg/mlとなるように蒸留水に溶解し、121℃で20分間加熱処理した後、1NのNaOHでpH7.0に調整した。本サンプルを、生理的食塩水で所定の濃度に希釈し、以下の試験を行った。

(1) Meth A細胞( $4 \times 10^6$  細胞/マウス)を8週令のBALB/cマウス(雌、体重約20g)の腹部に皮下注射した。その後、引き続いて同じ箇所にて10日間連続してガラクツロン酸加熱処理物(100mg/kg/日)又はグルクロン酸加熱処理物(100mg/kg/日)を皮下注射した。

2週間後にマウス腹部に形成されたがん組織を摘出して、その重量を測定した。

結果を表21に示す。すなわち、コントロール群では平均がん重量は1.48

mg/g、2週間後

ガラクツロン酸加熱処理物投与群では0.86gであり、抑制率は各々20%、25%、49%でいずれも有意(コントロール群に対し $p < 0.05$ )な制がん作用が認め

られた。

表 2 1

マウス	匹数	腫瘍重量 (g)	抑制率 (%)
		平均 ± SD	
コントロール	8	1.48 ± 0.54	—
ガラクトン酸加熱 処理物	6	0.94 ± 0.25	26.5
グルクロン酸加熱処理物	7	0.86 ± 0.31	41.9

(2) 6週齢の雌性ICR系マウス(体重約26g)16匹を用い、Sarcoma-180( $5.5 \times 10^6$  細胞/マウス)を腹部に皮下注射し、コントロール群8匹及びグルクロン酸加熱処理物投与群8匹を設定した。

グルクロン酸加熱処理物投与群には、グルクロン酸化熱処理物の摂取量が約1g/kg/日となるよう上記グルクロン酸加熱処理物を水道水に希釈し、給水瓶にて自由摂取させた。コントロール群には同様に水道水を与えた。餌は両群とも実験期間中、自由摂食とした。

Sarcoma-180皮下注射後35日目の生存個体数はコントロール群で8例中2例、グルクロン酸加熱処理物投与群で8例全例で、グルクロン酸加熱処理物の経口摂取による顕著な延命効果が認められた。

### 実施例30

マウス白血病細胞株P-388( $1 \times 10^6$  細胞/ml)を実施例29で調製したガラクトン酸加熱処理物(1mg/ml)、グルクロン酸加熱処理物(1mg/ml)と共に10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で6時間インビトロ(in vitro)で培養した後、8週令のDBA/2マウス(雌、



体重約20g)にその1mlをマウス腹腔内に注射した(P-388:  $1 \times 10^6$  細胞/マウス、加熱処理物50mg/kg)。コントロール群には生理的食塩水と共に同様の条件で培養したP-388細胞( $1 \times 10^6$  細胞/マウス)を注射した。なお、同時に並行して行った試験で、6時間のインビトロで培養した後のP-388細胞の生存率は加熱処理物添加群と生理食塩水添加群においての差はなく、いずれも生存率100%であった。

各群それぞれマウス8匹ずつを使用し、その生存数より、平均生存日数及び延命率を算出した。

結果を図16に示す。すなわち図16は各群のP-388細胞移植後の日数とマウスの生存数の関係を示す図であり、縦軸はマウス生存数、横軸はマウスの生存日数を示し、図中、実線はコントロール群、破線はガラクトロン酸加熱物投与群、二点鎖線はグルクロン酸投与群を示す。

図16の結果から算出されるように、コントロール群では平均生存日数11.4日であったが、ガラクトロン酸加熱処理物投与群(50mg/kg)においては細胞移植後24日目において平均生存日数23.5日以上、延命率206.1%以上、グルクロン酸加熱処理物投与群(50mg/kg)においては平均生存日数16.8日、延命率147.3%を示し、それぞれコントロール群に比べ有意な延命効果が認められた。

### 実施例31

10gのD-グルクロン酸(シグマ社製 G5269)を1lの水に溶解し、121℃で4時間加熱した後NaOHでpH7に中和した。

$1 \times 10^5$ /mlのHL-60細胞(ATCC CCL-240)を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地に500μg/ml、5μg/mlまたは0.05μg/mlの本加熱物を添加し、5%炭酸ガス存在下37℃で3日間培

養した。

培養後、細胞を固定した。

次に「日本組織培養学会編、朝倉書店、1982年刊」101頁に記載のギムザ染色を行い、光学顕微鏡で分化程度を観察した。その結果、添加したグル

グルクロン酸加熱物の濃度に依存し、がん細胞が単球またはマクロファージ様細胞に分化し、培養細胞中の成熟骨髄細胞比率が高くなった。その結果を図17に示す。すなわち図17は培養時間と、培養細胞中において成熟骨髄細胞の占める比率の関係を示す図であり、横軸は培養時間(日)、縦軸は培養細胞中において成熟骨髄細胞の占める比率(%)を示す。図17において白四角印(□)は試料無添加(対照)、白菱形印(◇)は500 $\mu$ g/mlグルクロン酸加熱物添加、白丸印(○)は5 $\mu$ g/mlグルクロン酸加熱物添加、白三角印(△)は0.05 $\mu$ g/mlグルクロン酸加熱物添加をそれぞれ示す。

### 実施例32

#### グルクロン酸加熱処理物の抗潰瘍作用

D-グルクロン酸(シグマ社製 G 5269)を10mg/mlになるように蒸留水に溶解し、121℃で4時間加熱処理した後、1NのNaOHでpH7.0に調整した後、凍結乾燥処理により200mg/mlまで濃縮し、グルクロン酸の加熱処理濃縮物を調製し、以下の実験を行った。

Wistarラット(体重220~275g)は、24時間絶食し、実験開始3時間前には絶水とした。

ラットに99.5%エタノールを1ml経口投与し、1時間後にエーテル麻酔下、胃を摘出した。摘出した胃は、幽門及び噴門を結紮し、1%ホルマリン液を注入後、同液中に10分間浸した。胃を大湾部に沿って切開し、腺胃部に発生している潰瘍の長さ(mm)を測定した。

グルクロン酸加熱処理物投与群は、エタノール投与の30分前に1g/kgの割合で上記グルクロン酸加熱処理濃縮物を経口投与した。コントロール群には同様に、蒸留水を投与した。

エタノール投与1時間後の潰瘍の長さは、コントロール群(N=6)で78.2 $\pm$ 28.5mm(平均 $\pm$ S.E.)であった。一方、グルクロン酸加熱処理物投与群(N=3)では潰瘍は全く存在せず、顕著な抗潰瘍作用が認められた。

### 実施例33 注射剤

実施例 8 記載のエタノール処理の上清画分の濃縮乾固物を注射用蒸留水に溶解し、1%溶液を調製した。この溶液を凍結乾燥用バイアル瓶 1 バイアル中に、上清画分の乾燥物換算で 10 mg 充てんし、凍結乾燥を行った。別に溶解液として生理食塩水 2 ml を添加した。

#### 実施例 3 4 注射剤

ガラクトロン酸を 10 mg/ml となるように注射用蒸留水に溶解し、121℃、20 分間の加熱処理を行い、次いで冷却後中和処理を行い加熱処理物の中性溶液を調製した。この溶液を凍結乾燥用バイアル瓶 1 バイアル中に、加熱処理物の乾燥物換算で 50 mg 充てんし、凍結乾燥を行った。別に溶解液として生理食塩水 2 ml を添加した。

#### 実施例 3 5 錠剤

下記処方に従い錠剤を調製した。

ベクチン酸加熱処理物	10 mg
コーンスターチ	65 mg
カルボキシメチルセルロース	20 mg
ポリビニルピロリドン	3 mg
ステアリン酸マグネシウム	2 mg
1 錠当たり	計 100 mg

ベクチンを実施例 7 に記載の方法で加熱処理し、中和後の凍結乾燥物をベクチン加熱処理物として使用した。

#### 実施例 3 6

緑茶葉 10 g、ビタミン C 0.2 g 及びイオン交換水 1000 ml を用い、常法を用いて製品を調製した。固形物換算で 100 mg を添加した。対照は、無添加のものとした。パネラー 20 名で、5 段階（5 良、1 悪）の官能評価を行い、

その結果の平均値を表 2 2 に示した。

表 2 2      官能評価

	本発明品 1	対照
味の幅	4. 1	3. 2
味のバランス	3. 8	3. 4
味の総合	4. 1	3. 3

表 2 2 より、本発明品 1 は対照に比べて、味の幅と広がりが増し、味とのバランスが整い、茶の香味が引き立ち、隠し味の効果が出ているとの評価であった。

### 実施例 3 7

アルコール含有飲料を表 2 3 に示す配合で、常法に従い調製した。

表 2 3 配合表

温州冷凍濃縮果汁 (B r i x 度 4 5)	1 1 0	g
グラニュー糖	8 0	g
クエン酸	2	g
クエン酸ナトリウム	0. 5	g
オレンジエッセンス	2	g
5 V / V % アルコール水溶液	残 余	
合計	1 0 0 0	m l

注：配合の飲料を 5℃に冷却後、ソーダーサイホンによって炭酸を含有させる。

本発明品 2 は、実施例 1 6 記載のペクチン加熱処理物 I を用い、製品 1 0 0 m l 当たり固形物換算で 4 5 m g 添加した。対照はペクチン加熱処理物 I 無添加のものを用了。官能評価は、実施例 3 6 と同様に行い、その結果を表 2 4 に示した。

表 2 4 官能評価

	本発明品 2	対照
味の幅	3. 8	3. 3
味のバランス	4. 0	2. 7

表 2 4 に示すごとく、本発明品 2 は対照に比較的に、味の幅と広がりが増した。特に、本発明品 2 は酸味がマイルドになり、みかんの風味が引き立つように仕上がった。

### 実施例 3 8

常法により調製された清酒を用い、本発明品 3 は、実施例 9 記載のペクチン加熱処理物 I I を用い、製品 1 0 0 m l 当り固形物換算で 3 5 m g を添加した。対照は、ペクチン加熱処理物無添加のものを用いた。

官能評価は、実施例 3 6 と同様に行なった。評価項目に香り、舌ざわり感を追加し、その結果を表 2 5 に示した。

表 2 5          官能評価

	本発明品 3	対照
味の幅	3 . 8	3 . 0
味のバランス	3 . 4	2 . 9
香り	2 . 9	2 . 9
舌ざわり感		
まろやかさ	3 . 8	2 . 6
なめらかさ	4 . 0	2 . 8
味の総合	3 . 6	2 . 8

表 2 5 より、本発明品 3 は対照に比べて、味の幅や広がりが改善され、舌ざわり感も向上して、嗜好品としての味及び食感が改善される効果を見出した。

## 実施例 39

常法により調製されたみりん及び発酵調味料を用い、本発明品 4（みりん）及び 5（発酵調味料）は、実施例 16 記載のペクチン加熱処理液 I を用い、製品 100 ml 当り固形物換算で 40 mg を添加した。対照は、ペクチン加熱処理物無添加のものを用いた。

官能評価は、実施例 36 と同様に行なった。その結果を表 26 に示した。

表 26 官能評価

	みりん		発酵調味液	
	本発明品 4	対照	本発明品 5	対照
味の幅	3.8	3.0	2.9	2.4
味のバランス	3.5	3.0	2.7	2.1
味の総合	3.6	3.1	2.8	2.2

表 26 より、本発明品 4 及び本発明品 5 は、それぞれの対照に比べ、味のバランスと幅において向上効果を示し、奥みのある味の調味料とすることができた。

## 実施例 40

ふりかけとして、魚粉 4.7 kg、海苔 0.8 kg、ごま 2.5 kg、食塩 1.0 kg、グルタミン酸ソーダ 0.5 kg を混合し、常法に従って造粒して調製し

本発明品 6 は、実施例 9 記載のペクチン加熱処理液 I を用い、製品 100 g 当り固形物換算 1000 mg を添加した。対照は、ペクチン加熱処理物無添加の

ものとした。これらふりかけを米飯にふりかけ、食感の官能評価を実施例 36 と同様にして行った。

その結果、本発明品 6 は対照に比べて、口に含んだとき、米飯とよくなじみ、味のバランスがよく、マイルドに仕上がり、総合してふりかけの品質を向上させることがわかった。

#### 実施例 4 1

野菜、果物の加熱処理物を用いて、飲料を作成した。その配合を表 27 に示す。

表 27

人参（根茎部）	200g
パイナップル（果実）	500g
バナナ（果実）	500g
グラニュー糖	76g
無水クエン酸	2g
水	残部
計	2000g

表 27 の配合の人参、パイナップル、バナナは各々市販のミキサーを用いて充分にかくはん、粉碎して、ピューレ状とした。本発明用品はこれらの人参、パイナップル、バナナのピューレを各々別に、密閉状態で 121℃、4 時間の加熱処理を行った後、配合表に従って、混合し飲料とした。

一方、対照は加熱処理することなく、そのまま配合表に従ってその粉碎物を混合し対照飲料とした。本発明品及び対照の官能評価を実施例 36 と同様に行った。その結果を表 28 に示す。



表 2 8      官能評価（平均値）

	本発明品	対照
香り	3.5	3.0
味	4.0	2.6
テクスチャー	4.3	3.2
総合	4.0	2.8
評	マイルドである 味馴れが良い 香りに一体感 舌触りまろやか	マイルド感がない 味が別々 香りがバランスに欠く ややざらつく

表 2 8 より、本発明品は対照と比較して、マイルドで味馴れに優れ、香りに一体感があり、舌触りもまろやかで、飲みやすい飲料に仕上がった。

#### 発明の効果

本発明の薬剤は感染症、免疫機能の低下又は昂進あるいはがん疾患、ウイルス性疾患、潰瘍、歯周病等の治療剤として用いることができる。また本発明のアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食品中の本発明の糖化合物は食品として長い歴史を有するものであり、これらから調製した本発明の加熱処理物は経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。また本発明の加熱処理物を含有する食品又は飲料、本発明の加熱処理物を

主性は高く、そのアポトーシス誘発作用、がん作用、血管新生抑制作用、抗ウイルス作用、抗潰瘍作用等により、消化器系がん、インフルエンザウイルスによ

るかぜ等のウイルス性疾患、潰瘍等の予防、治療に、肝機能改善等極めて有用である。

以上、本発明の加熱処理物は、安価に簡便に製造でき、その種々の生理的機能により、食品又は飲料の添加剤として使用することにより、食品又は飲料に簡便に種々の生理的機能、抗菌力、アポトーシス誘発作用、制がん作用、抗ウイルス作用等を付与することができ、本発明の加熱処理物は食品又は飲料への添加剤、特に食品又は飲料用防腐剤として極めて有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記 (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも 1 種の物の加熱処理物。
  - (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
  - (b) ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、
  - (c) ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物。
2. ウロン酸がガラクトツロン酸、グルクロン酸、グルロン酸、マンヌロン酸及び／又はイズロン酸である請求項 1 に記載の加熱処理物。
3. 誘導体がウロン酸ラクトン、ウロン酸エステル、ウロン酸アミド又はその塩である請求項 1 に記載の加熱処理物。
4. 糖化合物がペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸及び／又はその分解物から選択される糖化合物である請求項 1 に記載の加熱処理物。
5. 60～350℃、数秒～数日加熱処理して得られる加熱処理物である請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物。
6. 酸性～中性の条件下で加熱処理を行って得られる加熱処理物である請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物。
7. 加熱処理物が分子置分画物である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物。
8. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とする食品又は飲料。
9. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を添加及び／又は希釈してなる請求項 8 に記載の食品又は飲料。
10. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とする制がん作用を有する食品又は制がん作用を有する飲料。
11. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とする
12. 請求項 1 に記載の抗菌剤を含有することを特徴とする助腸剤。
13. 請求項 1 に記載の抗菌剤を含有することを特徴とする歯磨剤。

14. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とするアポトーシス誘発剤。
15. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とする制がん剤。
16. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とするがん細胞分化誘導剤。
17. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を含有することを特徴とする抗潰瘍剤。
18. 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物を有効成分として使用することを特徴とするアポトーシス誘発方法。
19. 下記 (a)、(b)、(c) より選択される少なくとも 1 種の物を加熱処理する工程を包含することを特徴とする加熱処理物の製造方法。
- (a) ウロン酸又はウロン酸誘導体、
  - (b) ウロン酸含有糖化合物又はウロン酸誘導体含有糖化合物、
  - (c) ウロン酸含有糖化合物含有物又はウロン酸誘導体含有糖化合物含有物。
20. ウロン酸がガラクトツロン酸、グルクロン酸、グルロン酸、マンヌロン酸及び／又はイズロン酸である請求項 19 に記載の加熱処理物の製造方法。
21. 誘導体がウロン酸ラクトン、ウロン酸エステル、ウロン酸アミド又はその塩である請求項 19 に記載の加熱処理物の製造方法。
22. 糖化合物がペクチン、ペクチン酸、アルギン酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、フコイダン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマタン硫酸及び／又はその分解物から選択される糖化合物である請求項 19 に記載の加熱処理物の製造方法。
23. 60～350℃、数秒～数日の加熱処理である請求項 19～22 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物の製造方法。
24. 酸性～中性の条件下で加熱処理を行う請求項 19～23 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物の製造方法。
25. 加熱処理物の分子量分画を行う工程を包含する請求項 19～24 のいずれか 1 項に記載の加熱処理物の製造方法。

図 1

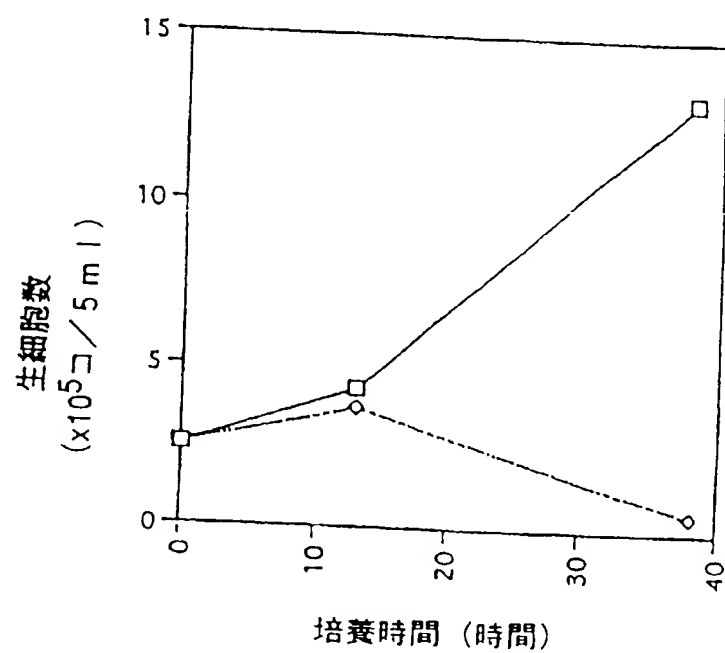


図 2

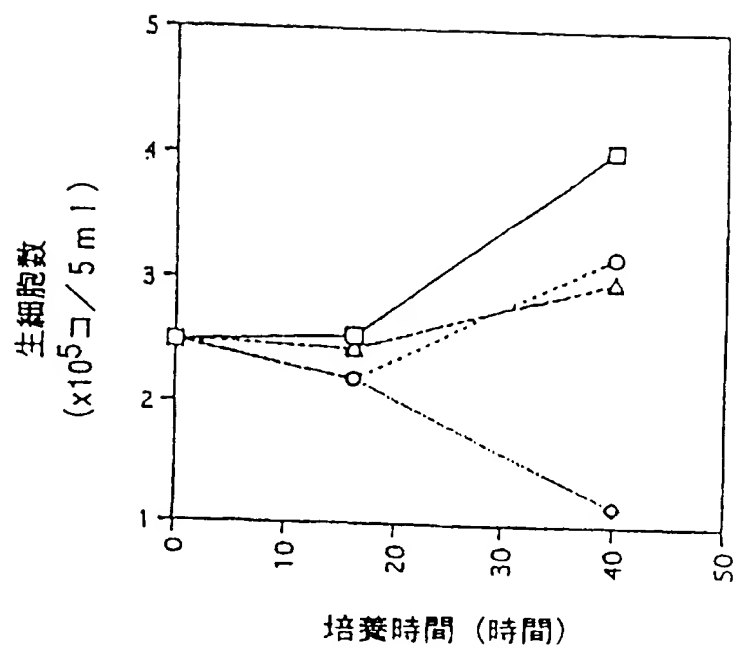


図 3

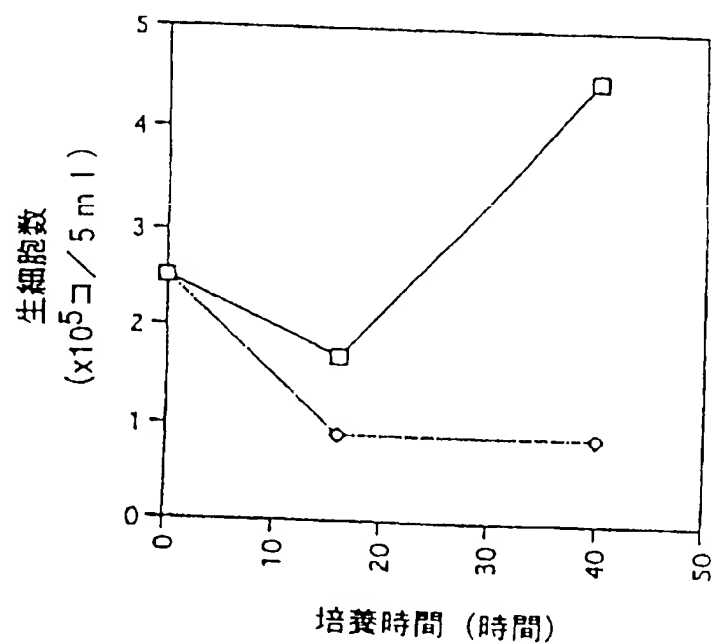


図 4

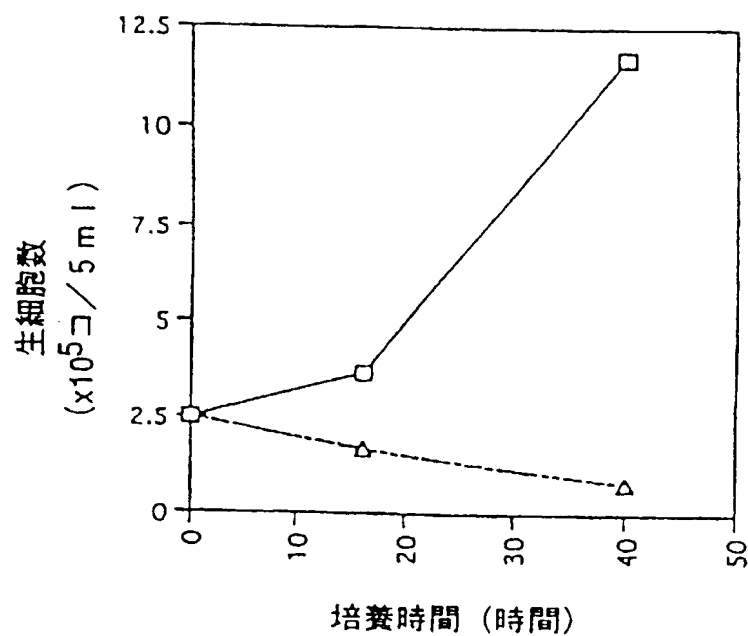




図 5

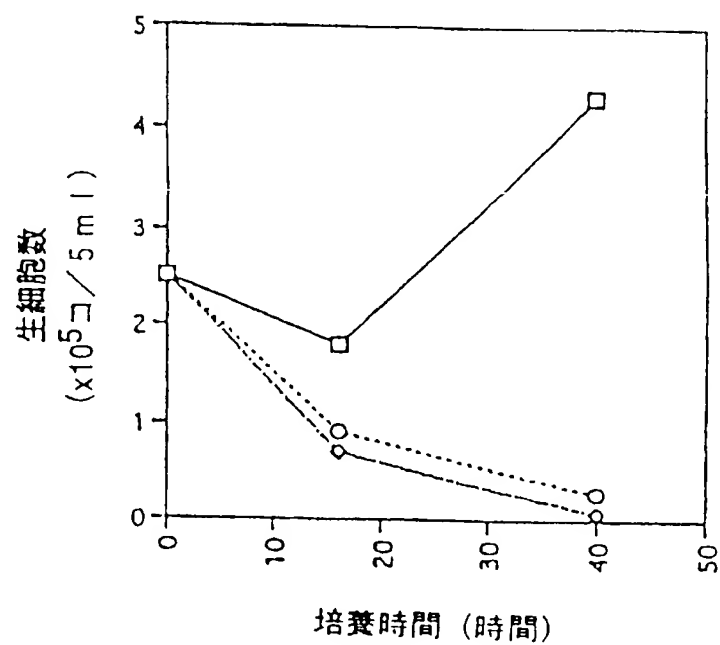


図 6

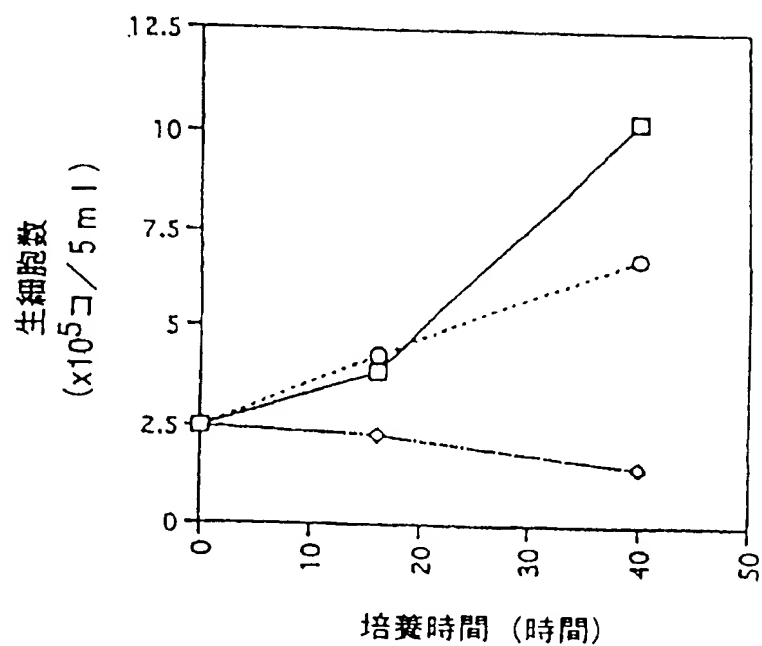


図 7

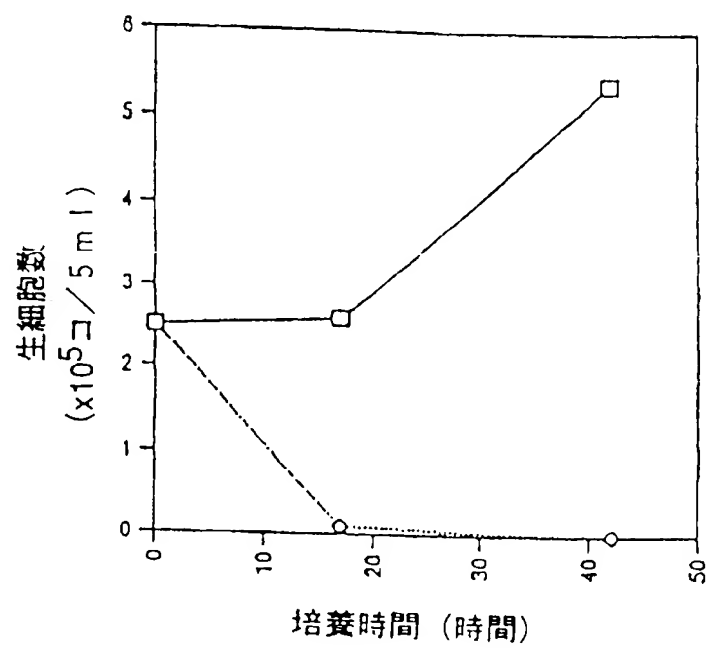


図 8

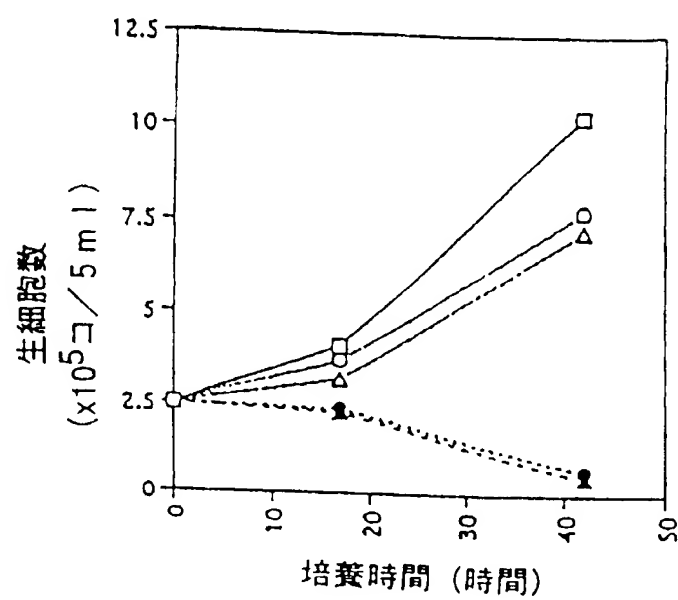


図 9

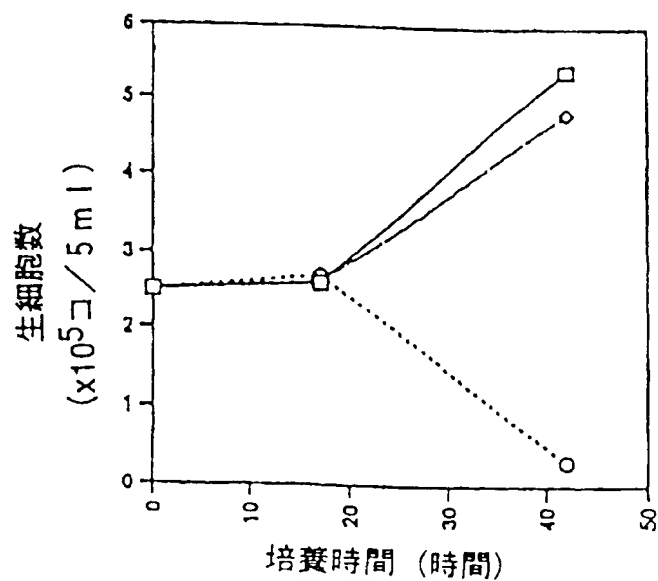


図 1 0

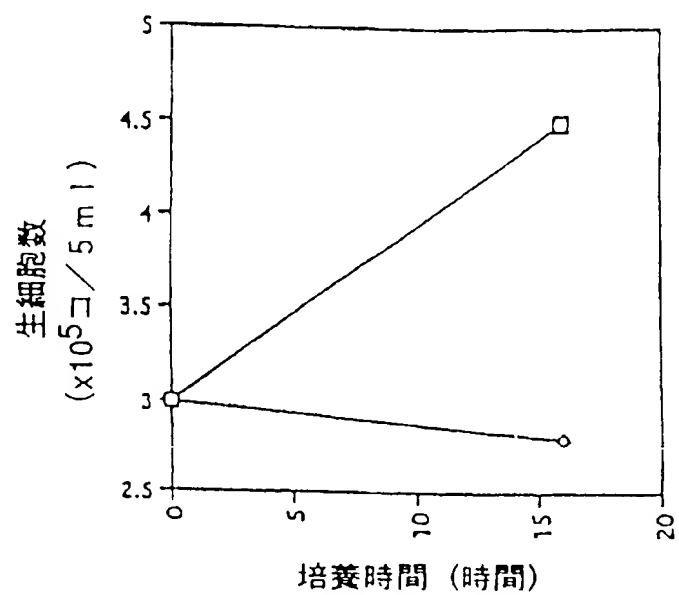


図 1 1

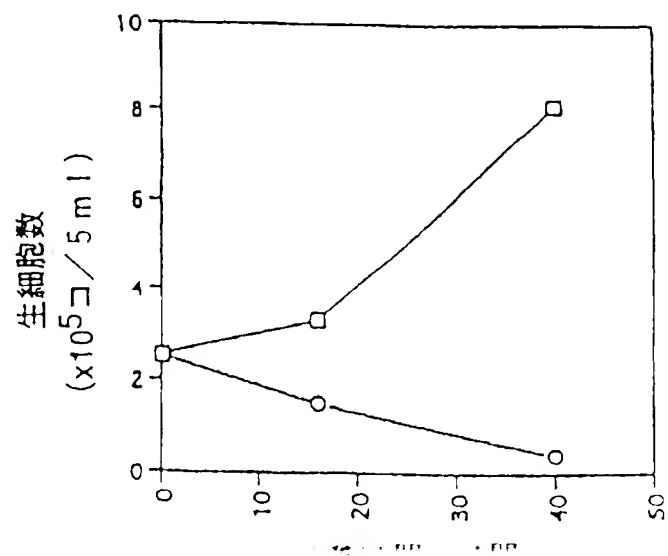


図 1 2

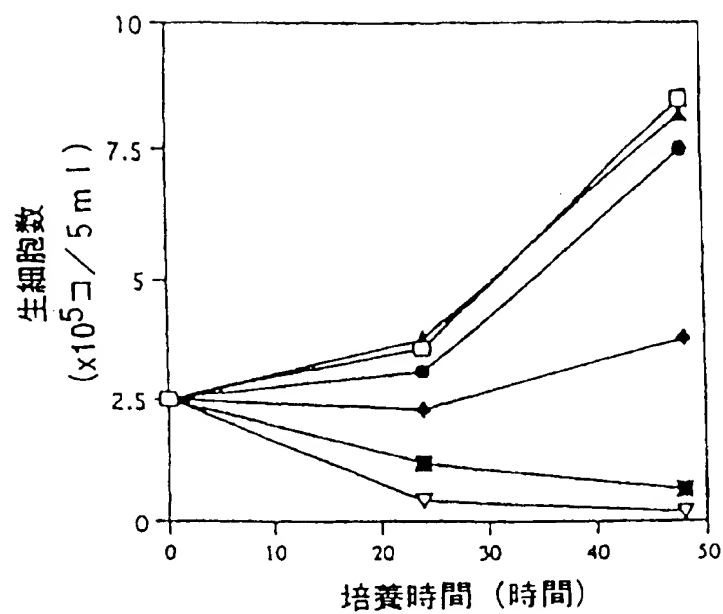


図 13

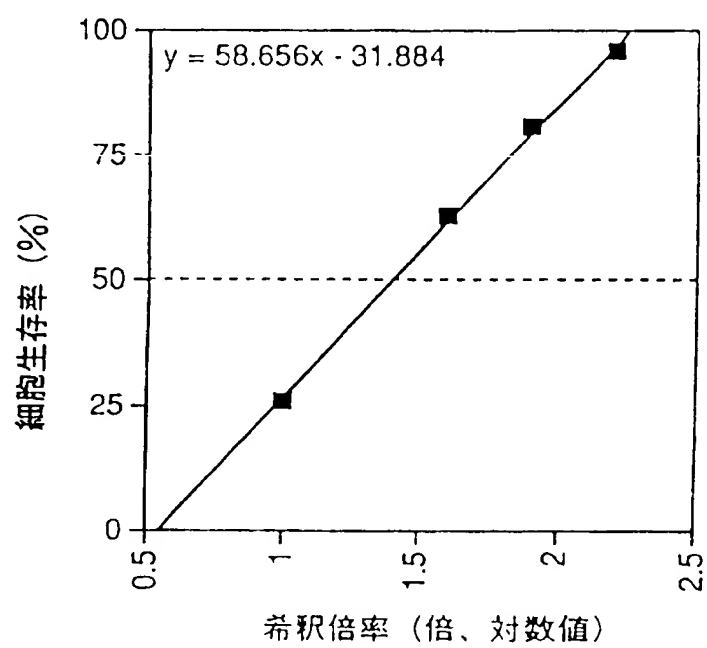


図 1 4

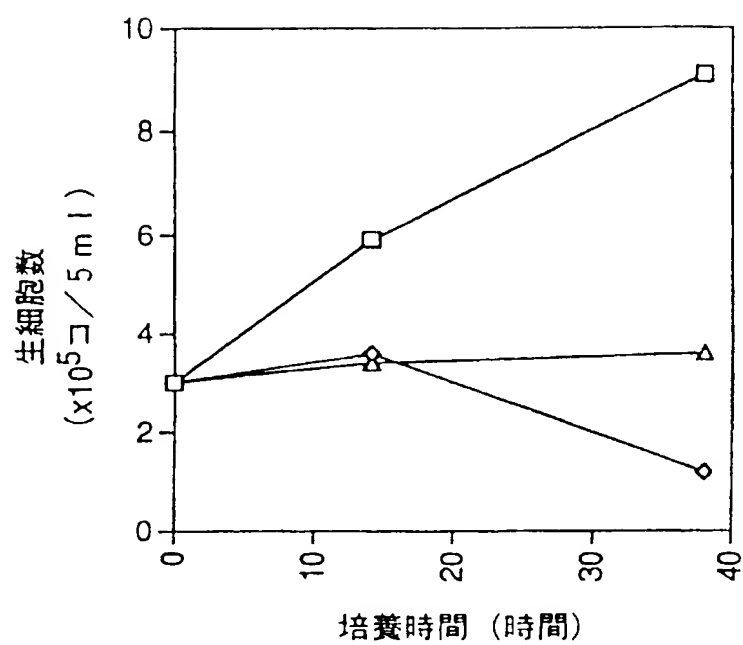




図 15

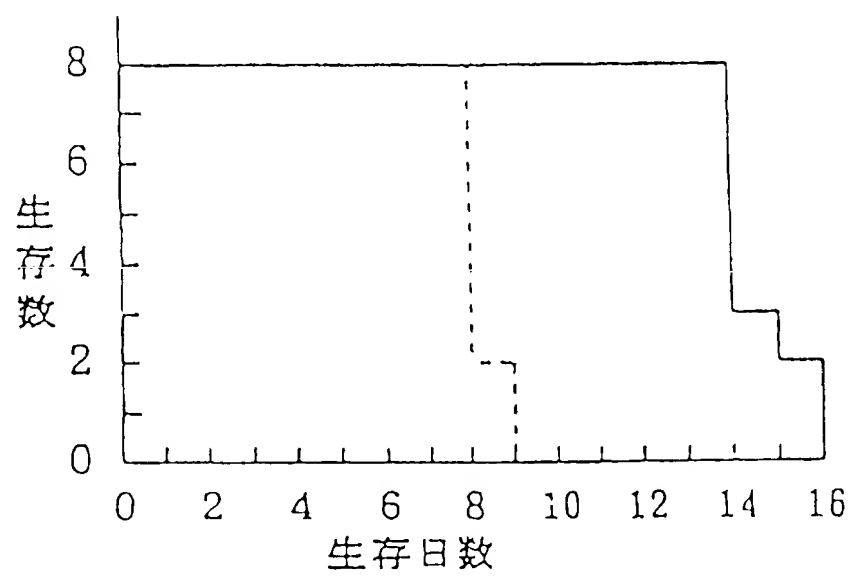
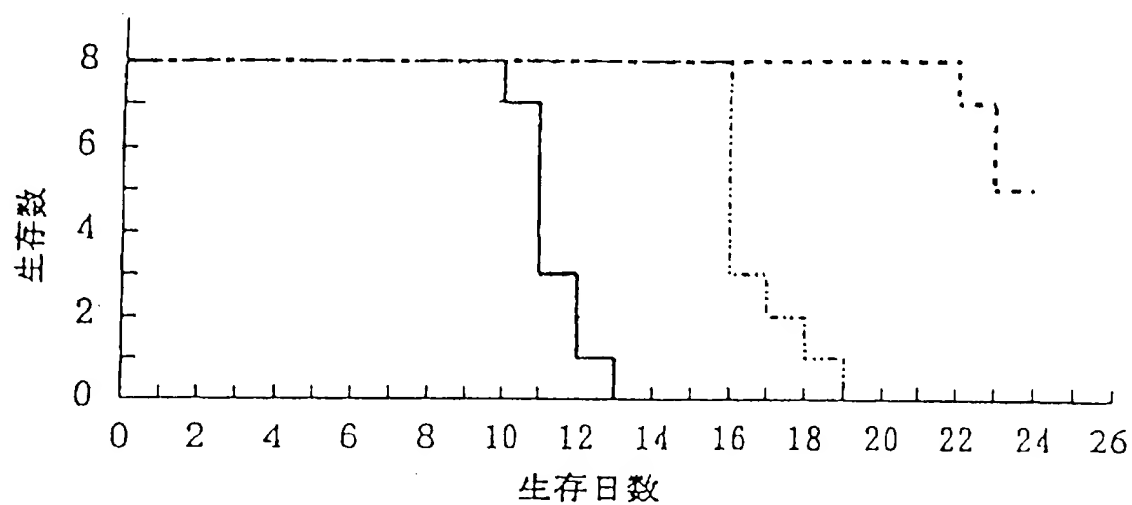


図 16

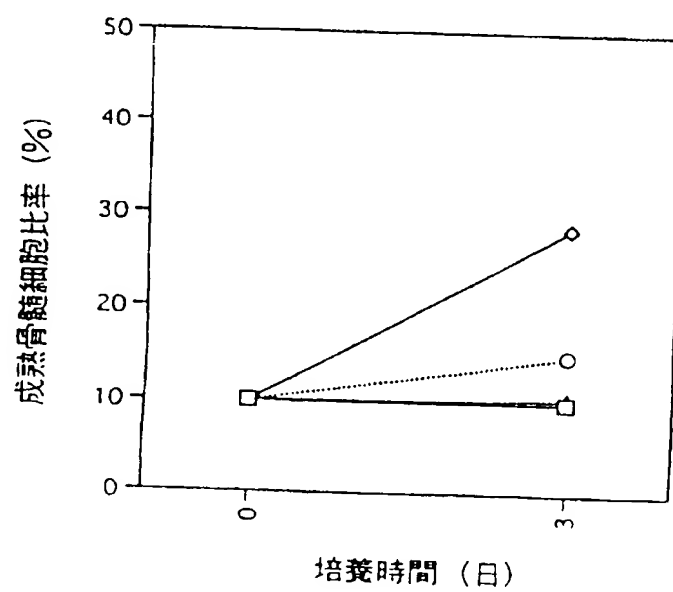


—— コントロール

----- ガラクトン酸加熱物

..... グルクロン酸加熱物

図 17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00527

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/00, 12, 70, 72, 74, 78, 7/16, 31/70, C07H7/033,  
A23L3/3562

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/00, 12, 70, 72, 74, 78, 7/16, 31/70, C07H7/033,  
A23L3/3562

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 7-215990, A (K.K. Tohsa Kogaku Kenkyusho), August 15, 1995 (15. 08. 95), Claim; example; paragraphs (0002), (0016) (Family: none)	1-12, 14-16, 19-25 13, 17
Y	JP, 4-36228, A (Lion Corp.), February 6, 1992 (06. 02. 92), Claim (Family: none)	13
X	JP, 4-18401, A (Tsumura & Co.), January 22, 1992 (22. 01. 92), Claim; example (Family: none)	1-7, 17, 19-25
X	JP, 7-228544, A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), August 29, 1995 (29. 08. 95), Claim; example; paragraphs (0002), (0007) (Family: none)	1-9, 13, 19-24
X	JP, 57-163478, A (Asama Chemical Co., Ltd.), October 7, 1982 (07. 10. 82), Claim; example & FR, 2502908, A	1-12, 19-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

<ul style="list-style-type: none"> <li>* Special categories of cited documents:</li> <li>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li>"E" earlier document but published on or after the international filing date</li> <li>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</li> <li>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</li> <li>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</li> <li>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</li> <li>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</li> <li>"&amp;" document member of the same patent family</li> </ul>
---	--

Date of the actual completion of the international search May 13, 1997 (13. 05. 97)	Date of mailing of the international search report May 20, 1997 (20. 05. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00527

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US, 4820520, A & IL, 65318, A	
X	JP, 63-226292, A (Merck & Co., Inc.), September 20, 1988 (20. 09. 88), Claim; example & EP, 12552, A & PT, 70476, A & ZA, 7906548, A & CA, 1160582, A	1-6, 19-24
X	JP, 62-29947, A (Ajinomoto Co., Inc.), February 7, 1987 (07. 02. 87), Claim (Family: none)	1-6, 8-10, 19-24
X	JP, 4-335839, A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), November 24, 1992 (24. 11. 92), Claim; example (Family: none)	1-6, 19-24
X	JP, 60-23319, A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), February 5, 1985 (05. 02. 85), Example; page 2, upper right column (Family: none)	1-7, 15, 16, 19-24
X	JP, 52-105199, A (Seikagaku Corp.), September 3, 1977 (03. 09. 77), Claim; example (Family: none)	1-6, 19-24
X	JP, 7-506493, A (Unilever N.V.), July 20, 1995 (20. 07. 95), Claim; example & WO, 9322938, A & AU, 9342694, A & ZA, 9303214, A & EP, 639056, A & US, 5538751, A	1-6, 8-10, 19-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP 97/00527

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A 61 K 35/00, 12, 70, 72, 74, 78, 7/16, 31/70,  
C 07 H 7/033, A 23 L 3/3562

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A 61 K 35/00, 12, 70, 72, 74, 78, 7/16, 31/70,  
C 07 H 7/033, A 23 L 3/3562

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 7-215990, A (株式会社糖鎖工学研究所), 15, 8月, 1995 (15, 08, 95), 請求の範囲、実施例、[0002]、[0016] 欄 (ファミリーなし)	1-12, 14-16, 19-25 13, 17
Y	J P, 4-36228, A (ライオン株式会社), 6, 2月, 1992 (06, 02, 92), 請求の範囲 (ファミリーなし)	13
X	J P, 4-18401, A (株式会社ツムラ), 22, 1月, 1992 (22, 01, 92), 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-7, 17, 19-25
X	J P, 7-228544, A (三菱レイヨン株式会社), 29, 8月, 1995 (29, 08, 95), 請求の範囲、実施例、[0002]、[0007] 欄 (ファミリーなし)	1-9, 13, 19-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

国際調査報告の発送日

20.05.97

特許庁 国際特許調査課

〒100 日本国特許庁

郵便番号: 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

電話番号 03-3561-1101 内線 3454

様式PCT/JP-A (第2版) 平成7年12月1日現在

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 57-163478, A (アサマ化成株式会社), 7. 10月. 1982 (07. 10. 82), 請求の範囲、実施例&FR, 2502908, A&US, 4820520, A&IL, 65318, A	1-12, 19-24
X	J P, 63-226292, A (メルク エンド カムパニー インコーポレーテッド), 20. 9月. 1988 (20. 09. 88), 請求の範囲、実施例&EP, 12552, A&PT, 70476, A&ZA, 7906548, A&CA, 1160582, A	1-6, 19-24
X	J P, 62-29947, A (味の素株式会社), 7. 2月. 1987 (07. 02. 87), 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6, 8-10, 19-24
X	J P, 4-335839, A (明治製菓株式会社), 24. 11月. 1992 (24. 11. 92), 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-6, 19-24
X	J P, 60-23319, A (株式会社中埜酢店), 5. 2月. 1985 (05. 02. 85), 実施例、第2頁右上欄 (ファミリーなし)	1-7, 15, 16, 19-24
X	J P, 52-105199, A (生化学工業株式会社), 3. 9月. 1977 (03. 09. 77), 請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-6, 19-24
X	J P, 7-506493, A (ユニリーバ・ナームローゼ・ベンノートシャープ), 20. 7月. 1995 (20. 07. 95), 請求の範囲、実施例&WO, 9322938, A&AU, 9342694, A&ZA, 9303214, A&EP, 639056, A&US, 5538751, A	1-6, 8-10, 19-24



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 18 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲18に係る発明は、人の身体の治療による処置方法を包含するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議申し立ては、次のとおりである。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人が異議申立てなかった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

